

12 **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: 88104916.7

22 Anmeldetag: 26.03.88

51 Int. Cl. 4: **C12N 15/00 , C07H 21/04 ,  
C12N 1/20 , C07K 13/00 ,  
C12P 21/00 , A61K 37/02 ,  
C12N 5/00 , G01N 33/577 ,  
/(C12N15/00,C12R1:19)**

30 Priorität: 28.03.87 DE 3710309  
28.03.87 DE 3710430  
28.03.87 DE 3710364  
04.11.87 DE 3737367

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
07.12.88 Patentblatt 88/49

54 Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Anmelder: **BOEHRINGER INGELHEIM  
ZENTRALE GMBH  
Postfach 200  
D-6507 Ingelheim am Rhein(DE)**

72 Erfinder: **Hauptmann, Rudolf, Dr.  
Döllachstrasse 22  
A-2483 Ebreichsdorf(AT)  
Erfinder: Maurer-Fogy, Ingrid, Dr.  
Lindauergasse 35  
A-1238 Wien(AT)  
Erfinder: Bodo, Gerhard, Prof. Dr.  
Belghofergasse 27/5  
A-1120 Wien(AT)  
Erfinder: Swetly, Peter, Prof. Dr.  
Hietzinger Hauptstrasse 40B  
A-1130 Wien(AT)  
Erfinder: Stratowa, Christian, Dr.  
Schellinggasse 3/9  
A-1010 Wien(AT)  
Erfinder: Falkner, Edgar, Dipl.-Ing. Dr.  
Strohberggasse 9/6  
A-1120 Wien(AT)  
Erfinder: Adolf, Günther, Dr.  
Stiftgasse 15-17/10  
A-1070 Wien(AT)  
Erfinder: Reutellingsperger, Christian Maria  
Peter, Dr.  
Looiersgracht 17  
NL-6211 JK Maastricht(NL)**

**EP 0 293 567 A1**

54 **Vascular-antikoagulierende Proteine, DNA die diese kodieren, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung.**

57 **Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind biologisch aktive Proteine, die für diese kodierenden DNA-Moleküle, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung.**

**Vascular-antikoagulierende Proteine, DNA die diese kodieren, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung**

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind biologisch aktive Proteine, die für diese kodierenden DNA-Moleküle, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung.

In den meisten Säugetieren existieren Proteine, die blutgerinnungshemmende Eigenschaften aufweisen. Diese Proteine können in drei Gruppen eingeteilt werden, wobei die Einteilung auf den unterschiedlichen Wirkmechanismen beruht.

1. Proteine, die mit dem Gerinnungsfaktor einen Komplex bilden und dadurch den Gerinnungsfaktor unwirksam machen. Dazu gehören die Proteine:

- a) Antithrombin-III (Thromb. Res. 5, 439-452 (1974))
- b)  $\alpha_1$ -Protease Inhibitor (Ann. Rev. Biochem. 52, 655-709 (1983))
- c)  $\alpha_2$ -Makroglobulin (Ann. Rev. Biochem. 52, 655-709 (1983))
- d) C<sub>1</sub>-Inhibitor (Biochemistry 20, 2738-2743 (1981))
- e) Protease Nexin (J. Biol. Chem. 258, 10439-10444, (1983)).

2. Proteine, die einen Gerinnungsfaktor proteolytisch zerschneiden und dadurch den Gerinnungsfaktor desaktivieren. Als einziges Protein dieser Art ist bisher Protein C beschrieben (J. Biol. Chem. 251, 355-363, (1976)).

3. Proteine, die die negativ geladenen Phospholipide abschirmen und/oder hydrolisieren, so daß die Phospholipid-abhängigen Reaktionen des Blutgerinnungsmechanismus gehemmt werden. Bisher sind nur Phospholipasen, die aus verschiedenen Schlangengiftsorten isoliert wurden, beschrieben worden (Eur. J. Biochem. 112, 25-32 (1980)).

Das stufenweise ablaufende Gerinnungssystem ist in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. Es wird als ein sich verstärkendes Mehrstufensystem verschiedener miteinander verbundener, proteolytischer Reaktionen verstanden, bei dem ein Enzym ein Zymogen in die aktive Form umsetzt (vgl. Jackson C.M., Nemerson Y., Ann. Rev. Biochem. 49, 765-811 (1980)). Die Geschwindigkeit dieser Reaktion wird in entscheidender Weise durch die Anwesenheit von Phospholipiden und anderer Kofaktoren wie Faktor V<sub>a</sub> und Faktor VIII<sub>a</sub> vergrößert. In vivo werden die Prokoagulationsreaktionen durch verschiedene Inhibitionsmechanismen geregelt, die einem explosiv thrombotischen Trauma nach einer geringen Aktivierung der Gerinnungskaskade vorbeugen.

Die Antigerinnungsmechanismen können wie folgt eingeteilt werden (Rosenberg, R.D., Rosenberg, J.S., J. Clin. Invest. 74, 1-6 (1984)):

1. Der Serin-Protease-Faktor X<sub>a</sub> und Thrombin werden infolge ihrer Bindung an Antithrombin III bzw. an den Antithrombin/Heparin-Komplex inaktiviert. Sowohl die Prothrombin-Aktivierung als auch die Bildung von Fibrin kann auf diese Weise gehemmt werden. Neben Anti-thrombin III gibt es noch verschiedene andere Plasma-Protease-Inhibitoren wie beispielsweise  $\alpha_2$ -Makroglobulin und Antitrypsin, deren Wirkung zeitabhängig ist.

2. Die Entdeckung des Protein C's führte zur Aufdeckung eines weiteren Antigerinnungsmechanismus. Ist das Protein C einmal aktiviert worden, wirkt es durch die selektive Proteolyse der Proteinkofaktoren Faktor V<sub>a</sub> und VIII<sub>a</sub>, durch die die Prothrombinase und das Enzym, das den Faktor X umsetzt, inaktiviert werden, als Antikoagulanzen.

3. Plasmin spaltet monomeres Fibrin 1, ein Produkt der Einwirkung von Thrombin auf Fibrinogen, wodurch der Bildung eines unlöslichen Fibrins vorgebeugt wird (Nossel, H.L., Nature, 291, 165-167 (1981)).

Von den oben genannten, in den Gerinnungsprozeß eingreifenden körpereigenen Proteinen ist z.Zt. nur das Antithrombin III in klinischem Einsatz. Als erheblicher Nachteil hat sich jedoch die bei der Anwendung dieses Proteins auftretende Erhöhung der Blutungsneigung herausgestellt.

Alle bisher als Antikoagulantien eingesetzten Mittel, ob körpereigener oder synthetischer Natur machen in irgendeiner Weise die Gerinnungsfaktoren unwirksam und führen dadurch zu Nebenwirkungen, die sich nachteilig auf den Gerinnungsprozeß auswirken können.

Überraschenderweise konnten nun neben diesen Proteinen weitere körpereigene Stoffe isoliert werden, die zwar die gewünschten blutgerinnungshemmenden Eigenschaften unter besonderen Bedingungen zeigen, hierbei aber die Blutungsgefahr nicht erhöhen. Bei größeren Blutungen verlieren diese Proteine ihre blutgerinnungshemmenden Eigenschaften und stören dadurch bei deren Verwendung nicht die in solchen Fällen überlebensnotwendigen Gerinnungsprozesse. Da sie erstmals isoliert wurden aus stark vaskularisiertem Gewebe, wurden sie "vascular anticoagulating proteins", VAC genannt.

Die aus stark vaskularisierten Geweben wie Nabelschnurgefäßen und Placenta isolierten Proteine

weisen Molekulargewichte von ca.  $70 \times 10^3$ , ca.  $60 \times 10^3$ , ca.  $34 \times 10^3$  und ca.  $32 \times 10^3$  auf, von denen die Substanzen mit den Molekulargewichten  $34$  respektive  $32 \times 10^3$  aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen. Die genaue biochemische Charakterisierung dieser Proteine, sowie deren Isolierung und Reinigung findet sich in der EP-A-0 181 465 vom 21. Mai 1986.

5 Proteine mit VAC Aktivität stellen natürliche Blutgerinnungshemmstoffe dar, die bei der Blutgerinnungskaskade an zwei Stellen eingreifen.

Das erste Mal inhibieren sie bei der durch die Faktoren IXa und VIIIa katalysierten Aktivierung des Faktors X zu Xa, das zweite Mal unterbinden sie die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin, die durch die Faktoren Xa und Va vermittelt wird. Beiden Aktivierungsschritten ist gemeinsam, daß sie Kalzium-Ionen und  
10 Phospholipide benötigen. Offenbar können VAC-Proteine ebenfalls mit Phospholipiden in Wechselwirkung treten, und durch diese Bindung die Aktivierungsschritte der Gerinnungsfaktoren blockieren.

Ihre Eigenschaften machen die Proteine zu interessanten, pharmakologisch äußerst wertvollen Wirkstoffen. Um sie jedoch in ausreichenden Mengen in hochreiner Form zur Verfügung zu haben ist deren Herstellung auf anderen als proteinreinigendem Weg aus natürlichem Gewebe erforderlich. Hierzu bietet  
15 sich die gentechnische Methode an.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, Proteine mit VAC-Aktivität gentechnisch herzustellen.

Gelöst wurde diese Aufgabe dadurch, daß die Aminosäuresequenz von Teilen der aus stark vaskularisiertem Gewebe isolierten und hochgereinigten Proteine mit VAC-Aktivität (EPA 0 181 465) aufgeklärt wurde, anhand dieser Sequenzen synthetische DNA-Sonden hergestellt wurden und hiermit geeignete  
20 sDNA-Bibliotheken durchsucht wurden. Nach Isolierung von mit den Sonden hybridisierender cDNA, deren Sequenzbestimmung sowie entsprechender Manipulation wurden diese cDNA in geeigneten Wirtssystemen beispielsweise in Bakterien, Hefen oder Säugetierzellen zur Expression gebracht.

Eines von den gereinigten Proteinen wurde enzymatisch mit Trypsin gespalten. Die entstandenen Peptide wurden aufgetrennt und ausgewählte Fragmente sequenziert. Die Sequenz des N-Terminus  
25 widersetzte sich jedoch einer direkten Analyse, da die erste Aminosäure offensichtlich blockiert ist.

Die Sequenzinformationen sind in Fig. 0.1 aufgeführt.

Zur Herstellung einer geeigneten DNA-Sonde sind prinzipiell drei Wege möglich. Ist ein längerer Abschnitt des Proteins, etwa 30 oder mehr Aminosäuren lang, bekannt, besteht die Möglichkeit, unter Beachtung der bevorzugt verwendeten Codons bei Säugern eine wahrscheinlichste Sequenz für den  
30 korrespondierenden mRNA Abschnitt zu erstellen. Eine solche Sonde ist im schlechtesten Fall etwa 66% homolog zur tatsächlichen Sequenz. Dies ist auch der Grund, weshalb die Sonde relativ lang sein müßte, um unter nicht stringenten Bedingungen hybridisieren zu können.

Die zweite Möglichkeit besteht darin, für einen kurzen Peptidabschnitt, ca. sechs bis sieben Aminosäuren lang, alle erdenklichen Variationen an Oligonukleotiden zu synthetisieren. Werden solch komplexe Mischungen beim Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken verwendet, können relativ viel "falsch" positiv reagierende Klone isoliert werden. Außerdem kann das Hybridisierungssignal sehr schwach ausfallen, da das  
35 perfekt passende Einzeloligonukleotid nur einen geringen Anteil an der Gesamtmischung ausmacht.

Der dritte Weg umgeht zwar nicht Variabilität einer Oligonukleotidsonde, sorgt aber durch die Wahl eines speziellen Nukleosidtriphosphats (ITP) dafür, daß an die gesuchte (oder auch "falsche") cDNA alle  
40 Moleküle der Sonde binden können. So wurden zu dem Tryptischen Peptid [P30/I] passende 23 Basen lange Oligonukleotide unter Verwendung von Inosintriphosphat synthetisiert.

Wie bereits erwähnt, können VAC-Proteine aus stark vaskularisiertem Gewebe isoliert werden. Gewebe der Wahl sind Nabelschnurgefäße oder Placenta. Daher und da bekannt ist, daß in der Placenta im Gegensatz zu anderen Spezial-Geweben fast alle Gene exprimiert werden, wurden die oben erwähnten  
45 DNA-Sonden verwendet, um eine placentale cDNA-Bibliothek, die aus placentalen Gewebe in an sich bekannter Weise hergestellt worden war nach cDNA-Molekülen, die für VAC-Proteine kodieren, zu durchsuchen.

Zum Durchsuchen der cDNA-Bibliothek nach für VAC-protein kodierender cDNA wurden entsprechend der Sequenzen des tryptischen Peptides P16/I zwei und des Staph A Peptides P20/I/6 ein Oligonukleotid  
50 synthetisiert (Fig.1). Diese Oligonukleotide stellen jeweils eine Mischung aller Varianten dar, die jede Kodierungsmöglichkeit der entsprechenden mRNA berücksichtigen. EBI-386 weist bei einer Kettenlänge von 20 Nukleotiden 512 Variationen auf und paßt zu dem Staph-A Peptid P20/I/6. Um die Variation bei dem Oligonukleotid für das tryptische Peptid P16/I niedriger zu halten, wurden zwei Oligonukleotide (20-mere) synthetisiert: EBI-387: 128 Variationen, EBI-388: 64 Variationen.

Weiters wurden zu dem tryptischen VAC-Peptid P30/I passend zwei Oligonukleotide unter Verwendung von Desoxyinosin als Base bei "Wobble" Positionen synthetisiert (Fig.2): EBI-118 und EBI-119. Diese Substitution wurde von E. Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260/5 (1985), pp.2605-2608, sowie Y. Takahashi et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (1985) pp.1931-1935, beschrieben. Inosin basenpaart gut mit Cytosin, stört jedoch

kaum die Ausbildung der Doppel-helix, wenn andere Nukleotide als Partner angeboten werden.

Nachdem jedes dieser Oligonukleotide in bekannter Weise radioaktiv markiert worden war, wurden Abzüge von Phagen-Platten hiermit nach bekannten Verfahren hybridisiert.

Aus der Hybridisierung mit EBI-386, -387 und -388 resultierten die Phagen Lambda-P11/3, Lambda-P6/5, Lambda-P6/6. Die Hybridisierung mit EBI-118 und -119 resultierte in den Phagen Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22.

Die aus den Phagen isolierten DNAs wurden mit EcoRI geschnitten und die entstehenden Fragmente isoliert. Die cDNA Inserts der Klone Lambda-P11/3, Lambda-P6/5 und Lambda-P6/6 hatten Größen von etwa 1300 bis 1400 bp. Die Sequenzanalyse zeigte, daß alle drei Klone von ein und derselben mRNA abgeleitet waren. Das 5'Ende der mRNA fehlte jedoch in den cDNAs. Die Inserts der Phagen Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22 hatten Längen von ca. 1600, 1100 und 1000 bp. Die Sequenzanalyse ließ eine annähernd vollständige cDNA vermuten.

Die cDNAs der beiden Phagengruppen Lambda-P11/3, Lambda-P6/5 und Lambda-P6/6 sowie Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22 sind von zwei verschiedenen mRNAs abgeleitet, wie die Sequenzanalyse ergab. Die EcoRI Inserts der drei Klone Lambda-P11/3, Lambda-P6/5 und Lambda-P6/6 wurden isoliert und in den EcoRI-geschnittenen Bluescribe M13<sup>+</sup> Vektor ligiert (Vector Cloning Systems, 3770 Tansy Street, San Diego, CA 92121, USA). Die resultierenden Klone wurden pP6/5, pP6/6 und pP11/3 genannt.

Die EcoRI Inserts der drei Klone Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22 wurden isoliert und in den EcoRI-geschnittenen Bluescribe M13<sup>+</sup> Vektor ligiert. Die resultierenden Klone wurden pRH201, pRH202 und pRH203 genannt.

Um weitere cDNA Klone zu erhalten, wurde die humane, plazentale Lambda-gt10 Bibliothek nochmals durchsucht, diesmal mit dem radioaktiv markierten EcoRI-Insert des pP11/3 als Sonde.

Insgesamt wurden 69 positiv reagierende Klone erhalten (Lambda-VAC1 bis Lambda-VAC69).

12 dieser Klone wurden im kleinen Maßstab wie oben beschrieben präpariert, die cDNA Inserts mit EcoRI freigesetzt und isoliert. Dabei zeigte sich, daß das Insert des Klons Lambda-VAC10 den gesamten für VAC Protein kodierenden Leserahmen enthält. Zur Charakterisierung der für VAC-alfa und VAC-beta kodierenden cDNAs wurden ein Northernblot-Experiment, Sequenzanalysen und eine genomische Southernblot-Analyse durchgeführt.

Das Ergebnis ist in Fig.3 abgebildet. Die cDNA des Klons pP11/3 hybridisiert an eine mRNA der Größe von etwa 1700 Basen ("VAC-alfa"), die cDNA des Klons pRH 203 an eine mRNA der Größe von etwa 2200 Basen ("VAC-beta").

Da erstens die eingesetzte Radioaktivitätsmenge sowie die aufgetragene Menge mRNA pro Spur etwa gleich war und zweitens die Hybridisierung eines Genom-Blots in derselben Lösung Banden gleicher Intensität mit beiden cDNAs ergab (siehe unten), ist zu schließen, daß die kürzere mRNA ("VAC-alfa") in größeren Mengen als die längere ("VAC-beta") mRNA in Plazenta vertreten ist.

Zur Sequenzanalyse der VAC-alfa cDNA wurden die cDNA Klone pP6/5, pP6/6 und pP11/3 total, sowie die der Klone Lambda-VAC1 bis -12 partiell sequenziert. Das Resultat ist in Fig. 4 abgebildet. Es wurden insgesamt 1465 Basen sequenziert. Die cDNA weist einen langen, offenen Leserahmen auf, der für 320 Aminosäuren kodieren kann. Wird die DNA Sequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt, so können alle sequenzierten Peptide der tryptischen Fragmente in dieser Sequenz untergebracht werden (Fig.5). Es handelt sich daher bei dieser cDNA um jene, deren korrespondierende mRNA für VAC-protein kodiert. Da die Sequenzen der zweiten isolierten cDNA für ein ähnliches, aber von VAC verschiedenes Protein kodiert, wird hier der Name VAC-alfa eingeführt.

Dem ersten ATG-Codon (Basen 35-37) geht im selben Leserahmen ein Stop-Codon voran. Die Basen 30 bis 38 erfüllen ziemlich gut die Kozakregel (M. Kozak, Nature 308 (1984), pp. 241-246), die die Konsensussequenz in der Nähe des Translationsstartcodons mit CC(A/G)CCAUGG angibt, die entsprechende Sequenz hier lautet TCGCTATGG. Die 3' nichttranslatierte Region ist 471 Basen lang. 15 Basen vor Beginn des poly-A Abschnitts befindet sich die Polyadenylierungssequenz AATAAA (N.J.Proudfoot et al., Nature 263 (1976), pp. 211-214). Wird eine Kettenlänge von 150 bis 200 Basen für den Poly-A Abschnitt der mRNA gerechnet, beträgt die Gesamtlänge der mRNA auf Grund der cDNA Sequenz 1600-1650 Basen. Da im Northern Blot Experiment ein höherer Wert bestimmt wurde, ist die 5'nichttranslatierte Region in keiner cDNA komplett enthalten.

Die cDNA des Klons pP6/5 weist im Gegensatz zu allen anderen cDNA Klonen an Position 100 C statt A auf. Dadurch würde sich das Triplet 98-100 (22. Codon) von GAA nach GAC ändern und für Asp anstelle von Glu kodieren. Diese Abweichung kann mehrere Ursachen haben: a) die Reverse Transkriptase baute ein falsches Nukleotid ein, b) es handelt sich um die Transkripte zweier alleler, an dieser Stelle verschiedener Gene oder c) es gibt zwei nicht allele Gene, die sich an dieser Position unterscheiden.



Der lange, offene Leserahmen kodiert für ein Protein mit 320 Aminosäuren, von dem das Met-1 wahrscheinlich abgespalten, und das folgende Alanin an der Aminogruppe, möglicherweise durch Acylierung, blockiert wird. Das errechnete Molekulargewicht beträgt 35.896 D und ist höher als der Wert nach SDS-PAGE. Allerdings ist der Anteil geladener Aminosäuren (Asp, Glu, Lys, Arg, His) mit 30,6 % (98/320) überdurchschnittlich hoch verglichen mit dem durchschnittlichen Wert von 25,1 %. Dies würde das veränderte Wanderungsverhalten des Proteins bei der SDS-PAGE erklären. Innerhalb der stark geladenen Aminosäuren überwiegen die sauren Aminosäuren (Asp und Glu) mit 54 gegenüber den basischen (Lys und Arg) mit 41. Dies erklärt den sauren, isoelektrischen Punkt des VAC- $\alpha$  Proteins ( $pI = 4,4$  bis  $4,8$ ) VAC- $\alpha$  enthält nur ein für Cystein codierendes Triplett (Aminosäure-Position 316); eine typische N-Glykosylierungsstelle (Asn-XXX-Ser/Thr) ist nicht vorhanden.

Eine Strukturanalyse der Aminosäuresequenz (modifiziert nach Pustell, J et al., Nucleic Acids Res. 10 (1982) pp 4765-4782) ergibt eine vierfache Wiederholung einer 67 Aminosäure langen Sequenz (Fig.6), im folgenden "Repeats" genannt. Innerhalb dieser Sequenz sind 7 Aminosäuren (10,4 %) in allen vier Repeats konserviert, 15 Aminosäuren (22,4 %) kommen in drei von vier Repeats vor, an 28 Positionen (41,8 %) enthalten jeweils zwei Repeats dieselbe Aminosäure.

Ein Vergleich mit publizierten Literaturdaten (M.J.Geisow, FEBS Letters 203 (1986), pp. 99-103, M.J.Geisow et al., TIBS 11 (1986), pp. 420-423) ergab überraschenderweise, daß VAC- $\alpha$  damit zu einer größeren Gruppe  $Ca^{++}$  abhängiger Phospholipidbindungsproteine gehört. Es wird eine Koinsensussequenz beschrieben (Lys-Gly-fob-Gly-Thr-Asp-Glu-var-var-Leu-Ile-fil-Ile-Leu-Ala-fob-Arg; fob=hydrophob, fil=hydrophil, var=variabel), die an der  $Ca^{++}$  Bindung beteiligt sein könnte (M.J.Geisow et al., Nature 320 (1986), pp. 636-638). Diese Sequenz findet sich in jeder der vier wiederholten 67 Aminosäure langen Subsequenzen der erfindungsgemäßen Proteine (Fig.6).

Auffällig ist auch der 6 Aminosäuren lange Abschnitt am Ende jeder Repeat, der fast ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren besteht ("ooooo" in Fig.6).

Die Sequenzanalyse der Klone Nr15, Nr19 und Nr22 ergab für die VAC-beta cDNA 1940 bp, die in einen poly-A Abschnitt übergeht (Fig.7). 96 Basen vor dem poly-A Abschnitt findet sich das Polyadenylierungssignal AATAAA. Allerdings kommt diese Konsensussequenz bereits an der Nukleotidposition 1704-1709 vor. Weshalb diese Sequenz nicht als Polyadenylierungssignal verwendet wird, ist unbekannt. Die zusätzlich erforderliche Sequenz an der 3'Seite der AATAAA Sequenz, YGTGTTY (Gill A. et al., Nature 312 (1984), pp. 473-474) kommt erst relativ weit entfernt vor (TGTGTTAT, Position 1735-1742); möglich, daß dies die Erklärung für ein Nichtakzeptieren dieser ersten Polyadenylierungssequenz darstellt.

Die cDNA enthält einen langen, offenen Leserahmen, der vom Beginn der cDNA bis Position 1087 reicht. Er würde ein Kodierungspotential für 362 Aminosäuren beinhalten. Aus Analogiegründen zu VAC- $\alpha$  und aufgrund der Tatsache, daß auch ein 34.000 D Protein bei der Reinigung von VAC anfällt (siehe E.P.A. 181.465) wurde das erste Methioninkodon (ATG, Position 107-109) als Translationsstart angenommen. Die Kozakregel ist hier nicht so gut erfüllt wie bei VAC- $\alpha$  (AAGAGATGG auf Position 102-110). Das resultierende Protein (VAC-beta) ist 327 Aminosäuren lang. Es besitzt 4 Cysteinreste (Aminosäureposition 161, 206, 250 und 293) und eine potentielle N-Glykosylierungsstelle (Asn-Lys-Ser, Aminosäureposition 225-227). Das errechnete Molekulargewicht beträgt 36.837 (Fig.9). Auch in VAC-beta gibt es überdurchschnittlich viele geladene Reste: 97/327 (29,6%), wobei die sauren Aminosäuren (Asp + Glu: 49) über die basischen (Lys + Arg 42) überwiegen; eine Erklärung für das nach SDS-PAGE ermittelte niedrigere Molekulargewicht.

Auch VAC-beta zeigt eine interne Wiederholung einer 67 Aminosäuren langen Sequenz (Fig.8). Innerhalb dieser Sequenz sind 7 Aminosäuren (10,4 %) in allen vier Repeats konserviert, 17 Aminosäuren (25,4 %) kommen in drei von vier Repeats vor, an 25 Positionen (37,7 %) enthalten jeweils zwei Repeats dieselbe Aminosäure. Auch VAC-beta zeigt gute Übereinstimmung mit der 17 Aminosäuren langen Konsensussequenz. Die Ausführungen zum VAC- $\alpha$  gelten analog für VAC-beta. Durch gezielte Mutationen in diesem Bereich könnte versucht werden, die biologische Aktivität der Proteine zu verändern. Erfindungsgemäßen Mutationen sehen beispielsweise den vollständigen oder teilweisen Ersatz der für die 17 Aminosäuren der konservierten Region kodierenden Bereiche vor.

Bei dem Vergleich der Proteine stellt man fest, daß der auffälligste Unterschied zwischen den Proteinen bei den N-terminalen Peptiden vorliegt. Erfindungsgemäße Modifikationen sehen daher den gegenseitigen Austausch dieser N-terminalen Peptide vor. Herstellen lassen sich diese modifizierten Proteine dadurch, daß die für diese N-terminalen Peptide kodierenden DNA-Moleküle, beispielsweise durch Oligonukleotidsynthese in an sich bekannter Weise hergestellt werden und mit der "Rest-DNA", die für die verbleibenden Repeats und die Linker-Abschnitte kodiert, ligiert wird. Mit dieser DNA versehene Expressionsvektoren können in bekannter Weise in geeigneten Wirtsorganismen zur Expression gebracht werden; das exprimierte Protein wird isoliert und gereinigt.

Die Analyse chromosomaler DNA aus humaner Plazenta nach Southern zeigt ein komplexes Bild. Die DNA wurde mit EcoRI, HindIII, BamHI und PstI geschnitten. Die auf Nitrozellulose transferierte DNA wurde sowohl mit einer VAC-alfa DNA (pP11/3) als auch mit einer VAC-beta DNA (pRH203) hybridisiert. Obwohl das Waschen der Filter unter stringenten Bedingungen erfolgte, ergaben sich bei jedem Verdau relativ viele Banden (Fig.10). Der Vergleich der beiden Blots zeigt, daß die Kreuzreaktion von VAC-alfa und -beta DNA unter diesen Bedingungen eher auszuschließen ist. Die Vielzahl der Banden ist entweder durch die Existenz jeweils ähnlicher Gene zu dem VAC-alfa bzw. VAC-beta Gen zu erklären, oder aber es handelt sich um jeweils ein Gen, das durch viele und/oder lange Introns unterbrochen ist.

In Fig.11 ist der Vergleich der Aminosäuresequenzen von VAC-alfa mit VAC-beta wiedergegeben. Die wiederholten Strukturen lassen sich in beiden Proteinen gleich anordnen. Die Verbindungspeptide sind ebenfalls gleich lang mit Ausnahme jener zwischen der 2. und 3. Repeat. In dieses Verbindungspeptid muß bei VAC-alfa eine Lücke eingeführt werden, um eine optimale Anpassung der beiden Sequenzen zu erlauben. Das N-terminale Peptid der beiden Proteine ist unterschiedlich lang, 19 Aminosäuren bei VAC-alfa, 25 Aminosäuren bei VAC-beta. Dieses Peptid weist auch die geringste Homologie auf. Die beiden Proteine sind an 176 von 320 Aminosäurepositionen ident, was einem Homologiegrad von 55,0% entspricht.

An dieser Stelle sei auch der Vergleich der Nukleotidsequenzen der VAC-alfa und -beta cDNAs eingefügt. Werden zwei Gene und deren Produkte miteinander verglichen, sieht man auf der DNA (= RNA) Ebene eine größere Homologie als auf der Aminosäureebene, was durch die Tatsache erklärt ist, daß bei der Nukleinsäure bereits eine Veränderung in einem Basentriplett ausreicht, um eine neue Aminosäure zu kodieren.

In Fig.12 ist der Vergleich der kodierenden Regionen von VAC-alfa und VAC-beta cDNA wiedergegeben. Überraschenderweise zeigen die DNAs nur einen Homologiegrad von 54,2%, also etwas weniger als die beiden Proteine.

In Fig.13 sind die Hydrophilizitätsprofile der beiden Proteine abgebildet. Dabei wurde der Algorithmus von Hopp und Wood verwendet (T.P.Hopp et al., Proc.Natl. Acad.Sci. 78 (1981) pp.3824-3828). Die vier Repeatbereiche sind durch die Balken angedeutet, die Verbindungspeptide in der darunter angegebenen Sequenz eingerahmt. Überraschenderweise ist das Verbindungspeptid zwischen der zweiten und dritten Repeat besonders hydrophil. In diesem Peptid befindet sich sowohl bei VAC-alfa als auch bei VAC-beta ein Arginin an identer Position. Es wäre daher möglich, daß dieses Arginin einen bevorzugten Angriffspunkt für eine Protease mit trypsinartiger Spezifität darstellt. Dabei müßte das Molekül in zwei etwa gleich große Hälften zerfallen. Es wäre denkbar, daß bereits ein solches "Halbmolekül" eine biologische, beispielsweise eine antikoagulierende Wirkung entfalten kann. Neben dem gezielten Verdau des Proteins beispielsweise mit einer Protease trypsinartiger Spezifität lassen sich diese Halbmoleküle oder Halbmoleküle mit geringen Modifikationen auf vielfältige Weise darstellen. So ist es möglich, die für diese Halbmoleküle kodierenden DNA-Moleküle, die nach an sich bekannten Verfahren herstellbar sind in geeignete Expressionsvektoren so einzufügen, daß diese DNA von den Expressionskontrollsequenzen reguliert wird und durch Kultivierung eines mit diesen Vektoren transformierten Wirtsorganismus die Halbmoleküle zu exprimieren, zu isolieren und zu reinigen.

Halbmoleküle mit geringen Modifikationen erhält man beispielsweise durch Einfügung von Spaltstellen, die dem vollständigen Protein die für bestimmte Proteasen erforderliche Spezifität verleihen. So läßt sich beispielsweise ein Protein mit einer Spaltstelle mit Faktor Xa-artiger Spezifität herstellen, indem in dem Abschnitt, der für die Linker-Sequenz zwischen der zweiten und dritten Repeat-Struktur kodiert, ein Oligonukleotid eingefügt wird, das für das Erkennungs-Tetrapeptid der Faktor-Xa-Protease kodiert. Hierdurch erhält man zunächst ein vollständiges Protein, das möglicherweise veränderte Eigenschaften, beispielsweise veränderte Stabilität gegenüber proteolytischem Angriff aufweist, andererseits aber eine hochspezifische Spaltstelle für die Faktor Xa-Protease enthält, wodurch gezielt zwei Halbmoleküle hergestellt werden und zum therapeutischen Einsatz gelangen können.

Durch gezielte Mutation der für Proteine mit VAC-Aktivität kodierenden DNA lassen sich außerdem Proteine herstellen, die einem proteolytischen Angriff besser widerstehen. So führt möglicherweise der Austausch des VAC-alfa und VAC-beta gemeinsamen Arginins zwischen der zweiten und dritten Repeat-Struktur durch a.B. Histidin zu besserer Stabilität der Proteine. Auch der gezielte Ersatz der übrigen Arginine und de Lysine durch Histidin, möglich durch Ersatz der entsprechenden Codone führt zu Proteinen, die ersichert durch Trypsin hydrolisiert werden können. Diese gezielten Mutationen lassen die biologischen, beispielsweise antikoagulierenden Eigenschaften der Proteine/Polypeptide im wesentlichen unbeeinflusst, führen andererseits jedoch zur Veränderung, beispielsweise zur Verbesserungen der Stabilität der Proteine, d.h. zu einer Veränderung der Halbwertszeit der Proteine.

In manchen Fällen ist es, beispielsweise für die Expression von Proteinen vorteilhaft, dem reifen, gewünschten Protein/Polypeptid eine Signalsequenz oder auch eine dem Wirtsorganismus eigene Protein-

sequenz vorzuschalten, so daß als Expressionsprodukt ein Fusionsprotein entsteht. Die für ein Signalpeptid kodierende Signalsequenz kann microbieller Herkunft sein oder aus Säugetierzellen stammen; vorzugsweise ist das Signalpeptid homolog zu dem Wirtsorganismus. Um diese Produkte in das gewünschte reife Protein überführen zu können, bedarf es einer spezifischen Spaltstelle zwischen dem Signal-/Fusionsanteil und dem reifen Protein. Hierzu kann man beispielsweise, wie oben beschrieben, an dieser Stelle ein Oligonukleotid einfügen, das für das Erkennungs- Tetrapeptid der Faktor-Xa-Protease kodiert. Hierdurch läßt sich das exprimierte Fusionsprotein gezielt mit der Faktor-Xa-Protease spalten. Man erhält das reife Protein.

Ersetzt man gezielt die für Methionin verantwortlichen Codone, außer dem an Aminosäureposition 1, durch Codone, die für Leucin, Isoleucin oder Valin kodieren, so läßt sich ein eventuell erhaltenes unreifes oder Fusionsprotein durch BrCN-Spaltung in das reife Protein überführen.

Sollte sich erweisen, daß derart modifizierte Proteine gleiche oder gegebenenfalls verbesserte biologische Eigenschaften aufweisen, so wäre dies ein möglicher Weg zur Ausbeutesteigerung und gegebenenfalls ein Verfahren zur Herstellung von Proteinen mit besseren Eigenschaften als die natürlichen VAC-Proteine.

Als weitere gezielte Mutation ist der gezielte Austausch von einem, gegebenenfalls mehreren Cysteinen durch Serin oder Valin zu nennen, indem die entsprechenden Codone ausgetauscht werden. Beeinflußt dieser Austausch die biologische Aktivität nicht nachteilig, so könnte dieser Weg eine Verbesserung der Isolierung und/oder Ausbeute der Proteine bewirken. Nicht auszuschließen ist auch hierbei eine Verbesserung der Eigenschaften der Proteine. Als weitere Mutation ist die Kombination verschiedener vollständiger oder Teil-Sequenzen der für die erfindungsgemäßen Proteine kodierenden DNAs vorgesehen, wodurch Hybridproteine mit vascular-antikoagulierenden Eigenschaften erhalten werden. Alle durch diese oder ähnliche Mutationen erhältlichen Proteine, die für diese kodierenden DNAs, deren Herstellung und Verwendung sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Aus Fig. 13 ist weiterhin leicht zu erkennen, daß weder VAC-alfa noch VAC-beta einen längeren, hydrophoben Bereich aufweisen, der entweder die Sekretion durch, oder das Einlagern der Proteine in eine Membran erlauben würde. Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei VAC-alfa und VAC-beta um intrazelluläre Proteine handelt.

Wallner et al (Nature 320 (1986), pp.77-81) berichten die Struktur des humanen Lipocortin I, Saris et al. (Cell 46 (1986), pp.201-212) und Huang et al. (Cell 46 (1986), pp. 191-199) die Struktur des murinen bzw. humanen Calpactin I, das auch Lipocortin II genannt wird. Diese Proteine gehören ebenfalls zu der Klasse der  $Ca^{++}$  abhängigen Phospholipidbindungsproteinen. Ihre Struktur läßt sich analog zu VAC-alfa und -beta anschreiben (Fig.14). Die Homologien zwischen VAC-alfa und VAC-beta sind jedoch ausgeprägter als jene zwischen VAC und Lipocortin:

VAC-alfa - VAC-beta : 55,0%  
 35 VAC-alfa - Lipocortin I : 41,9%  
 VAC-alfa - Lipocortin II : 43,8%  
 VAC-beta - Lipocortin I : 41,7%  
 VAC-beta - Lipocortin II : 44,6%

Anzunehmen ist daher, daß auch die Lipocortine aufgrund ihrer analogen Struktur antikoagulierende Wirkung haben, und demzufolge als Antikoagulanzen einzusetzen sind und weiterhin, daß dies eine generelle Eigenschaft dieser Klasse von  $Ca^{++}$  abhängiger Phospholipidbindungsproteine ist. Aufgrund der analogen Strukturen läßt sich auch erklären, daß die erfindungsgemäßen Proteine neben der antikoagulierenden Wirkung auch die Eigenschaften der bereits bekannten  $Ca^{++}$  abhängigen Phospholipidbindungsproteine aufweisen. Beispielhaft genannt seien hier die antiinflammatorischen Eigenschaften der Lipocortine. Die diesen Proteinen eigene Phospholipase Inhibitor-Wirkung konnte auch für die erfindungsgemäßen Proteine nachgewiesen werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Proteine als antiinflammatorische Mittel sowie die Verwendung der erfindungsgemäßen Proteine bei der Behandlung sämtlicher für die Lipocortine geltenden Indikationen wie beispielsweise rheumatische Erkrankungen. Auch für diesen Einsatzzweck lassen sich die, den natürlichen Proteinen entsprechenden erfindungsgemäßen Produkte in der bereits erwähnten Weise abändern und deren Eigenschaften gegebenenfalls verbessern.

Bei dem Vergleich der Proteine VAC-alfa, VAC-beta, Lipocortin I und Lipocortin II stellt man fest, daß der auffälligste Unterschied zwischen den Proteinen bei den N-terminalen Peptiden vorliegt, insbesondere zwischen den VAC-Proteinen auf der einen und den Lipocortinen auf der anderen Seite. Eine erfindungsgemäße Modifikation sieht daher den gegenseitigen Austausch dieser N-terminalen Peptide vor. Herstellen lassen sich diese modifizierten Proteine dadurch, daß die für diese N-terminalen Peptide kodierenden

DNA-Moleküle, beispielsweise durch Oligonukleotidsynthese in an sich bekannter Weise hergestellt werden und mit der "Rest-DNA", die für die verbleibenden Repeats und die Linker-Abschnitte kodiert, ligiert wird. Mit dieser DNA versehene Expressionsvektoren können in bekannter Weise in geeigneten Wirtsorganismen zur Expression gebracht werden; das exprimierte Protein wird isoliert und gereinigt.

Viele Mitglieder der  $\text{Ca}^{++}$  abhängigen Phospholipidbindungsproteine binden an gereinigte sekretorische Vesikel oder andere Bestandteile des Cytoskeletts (siehe R.H.Kretsinger et al., Nature 320 (1986), p.573 für eine Zusammenfassung). Bei der Sekretion kapseln sich die Vesikel vom Golgi-Apparat der Zelle ab, wandern zur Zellmembran und fusionieren mit ihr. Dabei wird der Inhalt der Vesikel von der Zelle freigesetzt. In Analogie zur Kupplung von Erregung mit der Muskelkontraktion wurde vorgeschlagen (W.W.Douglas, Br.J.Pharmac. 34 (1968), 451), daß auch der Stimulus und die Sekretion über  $\text{Ca}^{++}$  gekoppelt ist. Dabei könnten die  $\text{Ca}^{++}$  abhängigen Phospholipidbindungsproteine eine wichtige Rolle spielen. In der konservierten, 17 Aminosäuren langen Region jeder Repeat besitzt VAC-alfa 5 bis 6 Hydroxylgruppen-enthaltende Aminosäuren (Asp, Glu, Thr, Ser), jeweils drei davon an identischer Position. Bei VAC-beta finden sich in jeder Repeat vier dieser Aminosäuren. Obwohl keines der Proteine die in Calmodulin, Troponin C, S-100 und Parvalbumin beobachtete EF-Hand Struktur aufweist (R.H.Kretsinger et al., CRC Crit. Rev.Biochem. 8 (1980), p119), die in diesen Molekülen für die  $\text{Ca}^{++}$  Bindung verantwortlich ist, verleitet die Konservierung dieses Unterabschnitts in jeder Repeat zu dem Schluß, daß diese Region für die  $\text{Ca}^{++}$  Bindung verantwortlich ist.

Durch gezielte Mutationen in diesem Bereich könnte versucht werden, die biologische Aktivität der Proteine zu verändern. Erfindungsgemäßen Mutationen sehen beispielsweise den vollständigen oder teilweisen Ersatz der für die 17 Aminosäuren der konservierten Region kodierenden Bereiche vor:

a. aus den VAC-Proteinen durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren der Lipocortine kodieren,

b. aus VAC-alfa durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren des VAC-beta kodieren und umgekehrt,

c. aus Lipocortin I durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren des Lipocortins II kodieren und umgekehrt,

d. aus den Lipocortinen durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren der VAC-Proteine kodieren oder

e. bei den übrigen Polypeptiden/Proteinen durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren der jeweils anderen Polypeptiden/Proteine kodieren, indem die entsprechenden für diese Aminosäuren kodierenden Bereiche ausgetauscht werden.

Die oben erwähnte analoge Struktur läßt außerdem erwarten, daß Proteine, die diese Analogie aufweisen, sowohl antiinflammatorische als auch antikoagulierende Wirkung zeigen und daher entsprechend therapeutisch und/oder prophylaktisch einsetzbar sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher insbesondere die Verwendung der Polypeptide als antiinflammatorische Mittel, als antirheumatische Mittel, in den für die Lipocortine geltenden Indikationen, die Verwendung der Polypeptide/Proteine, die Repeat-Bereiche aufweisen, als blutgerinnungshemmende Mittel, als Thrombin-inhibierende Mittel, als antiinflammatorische Mittel, als antirheumatische Mittel, Verwendung der Lipocortine als blutgerinnungshemmende Mittel, als Thrombin-inhibierende Mittel und in den für die VAC-Proteine geltenden Indikationen, wobei die bekannten Verwendungen der zum Teil in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Proteine mit solchen Repeat-Bereichen ausdrücklich ausgenommen sind.

Weiterhin sind Mittel zur therapeutischen Behandlung, die neben pharmazeutisch inerten Trägerstoffen eine wirksame Menge eines dieser Polypeptide enthält, Gegenstand der Erfindung.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch DNA-Moleküle, die für ein Polypeptid/Protein mit Repeat-Bereichen kodieren, DNA-Moleküle, die für einen der Repeat-Bereiche kodieren, DNA-Moleküle, dadurch gekennzeichnet, daß die für die vollständigen Repeats kodierenden Bereiche umgeordnet sind, die von diesen kodierten Proteine, deren Herstellung und Verwendung.

Alle durch diese oder ähnliche Mutationen erhältlichen Proteine, die für diese kodierenden DNAs, deren Herstellung und Verwendung sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung, wobei die bekannten zum Teil in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Proteine, die für diese kodierenden DNAs, deren bekannte Herstellung und Verwendung ausdrücklich ausgenommen sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch DNA-Moleküle nicht-humanen Ursprungs, die von diesen kodierten Proteine, deren Herstellung und Verwendung, die in einer, der vorliegenden Erfindung analogen Weise herstellbar sind.

Gegenstand der Erfindung sind nicht nur Gen-Sequenzen, die spezifisch für die erfindungsgemäßen Proteine codieren, sondern ebenfalls Modifikationen, die leicht und routinemäßig durch Mutation, Abbau,

Transposition oder Addition erhalten werden können. Jede Sequenz, die für die erfindungsgemäßen Proteine codiert (d.h. die das biologische Aktivitätsspektrum aufweist, das hier beschrieben ist) und im Vergleich mit den gezeigten degeneriert ist, ist ebenfalls eingeschlossen; Fachleute aus diesem Gebiet sind in der Lage, DNA-Sequenzen der codierenden Regionen zu degenerieren. Ebenso ist jede Sequenz, die für ein Polypeptid mit dem Aktivitätsspektrum der erfindungsgemäßen Proteine codiert, und die mit den gezeigten Sequenzen (oder Teilen davon) unter stringenten Bedingungen hybridisiert (beispielsweise Bedingungen, die für mehr als 85 %, bevorzugt mehr als 90 % Homologie selektieren beinhaltet).

Die Hybridisierungen werden in 6xSSC/5x Denhardt's Lösung/0,1% SDS bei 65 °C durchgeführt. Der Grad der Stringenz wird im Waschschritt festgelegt. So sind für eine Selektionierung auf DNA-Sequenzen mit ca. 85 % oder mehr Homologie die Bedingungen 0,2xSSC/0,01% SDS/65 °C und für eine Selektionierung auf DNA-Sequenzen mit ca. 90 % oder mehr Homologie die Bedingungen 0,1x SSC/0,01% SDS 65 °C geeignet.

Die Erfindung betrifft weiterhin Expressionsvektoren, die eine für VAC kodierende DNA-Sequenz enthalten, die von einer Expressionskontrollsequenz derart reguliert wird, daß in einer mit diesem Expressionsvektoren transformierten Wirtszelle Polypeptide mit VAC-Aktivität exprimiert werden.

Die Expressionsvektoren der vorliegenden Erfindung werden z.B. hergestellt, indem man in eine Vektor-DNA, welche eine Expressionskontrollsequenz enthält, eine VAC kodierende DNA-Sequenz derart einfügt, daß die Expressionskontrollsequenz besagte DNA-Sequenz reguliert.

Die Wahl eines geeigneten Vektors ergibt sich aus der zur Transformation vorgesehenen Wirtszelle. Geeignete Wirte sind beispielsweise Mikroorganismen, wie Hefen, z.B. Saccharomyces cerevisiae, und insbesondere Bakterienstämme, die über kein Restriktions- oder Modifikationsenzym verfügen, vor allem Stämme von Escherichia coli, z.B. E. coli X1776, E. coli HB101, E. coli W3110, E. coli HB101/LM1035, E. coli JA221(30) oder E. coli K12 Stamm 294, Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus, Pseudomonas, Haemophilus, Streptococcus und andere, ferner Zellen höherer Organismen, insbesondere etablierte humane oder tierische Zelllinien. Bevorzugte Wirtszellen sind die gesamten Stämme von E. coli, insbesondere E. coli HB101, E. coli JM101 und E. coli W3110.

Grundsätzlich sind alle Vektoren geeignet, welche die erfindungsgemäßen heterologen, für die VAC kodierenden DNA-Sequenzen in dem gewählten Wirt replizieren und exprimieren.

Beispiele für Vektoren, die zur Expression des VAC-Gens in einem E. coli-Stamm geeignet sind, sind Bacteriophagen, z.B. Derivate des Bacteriophagen  $\lambda$ , oder Plasmide, wie insbesondere das Plasmid colE1 und seine Derivate, z.B. pMB9, pSF2124, pBR317 oder pBR322. Die bevorzugten Vektoren der vorliegenden Erfindung leiten sich von Plasmid pBR322 ab. Geeignete Vektoren enthalten ein vollständiges Replicon und ein Markierungsgen, welches die Selektion und Identifizierung der mit den Expressionsplasmiden transformierten Mikroorganismen auf Grund eines phänotypischen Merkmals ermöglicht. Geeignete Markierungen verleihen dem Mikroorganismus beispielsweise Resistenz gegenüber Schwermetallen, Antibiotika und dergleichen. Weiterhin enthalten bevorzugte Vektoren der vorliegenden Erfindung außerhalb der Replicon- und Markierungsgen-Regionen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen, so daß an diesen Stellen die für die Aminosäuresequenz von VAC kodierende DNA-Sequenz und gegebenenfalls die Expressions-Kontrollsequenz eingefügt werden können. Ein bevorzugter Vektor, das Plasmid pBR322, enthält ein intaktes Replicon, gegen Tetracyclin und Ampicillin Resistenz verleihende Markierungsgene ( $tet^R$  und  $amp^R$ ) und eine Reihe von nur einmal vorkommenden Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen, z.B. PstI (schneidet im  $amp^R$ -Gen, das  $tet^R$ -Gen bleibt intakt), BamHI, HindIII, SalI (schneiden alle im  $tet^R$ -Gen, das  $amp^R$ -Gen bleibt intakt), NruI und EcoRI.

Mehrere Expressionskontrollsequenzen können zur Regulation der VAC-Expression eingesetzt werden. Insbesondere werden Expressionskontrollsequenzen stark exprimierter Gene der zu transformierenden Wirtszelle verwendet. Im Falle von pBR322 als Hybridvektor und E. coli als Wirtsorganismus sind beispielsweise die Expressionskontrollsequenzen (welche unter anderem den Promotor und die ribosomale Bindungsstelle enthalten) des Lactoseoperons, Tryptophanoperons, Arabinoseoperons und dergleichen, des  $\beta$ -Lactamasegens, die entsprechenden Sequenzen des Phage  $\lambda$ N-Gens oder des Phage fd-Schichtproteinogens und andere geeignet. Während der Promotor des  $\beta$ -Lactamasegens ( $\beta$ -lac-Gen) bereits in Plasmid pBR322 enthalten ist, müssen die übrigen Expressionskontrollsequenzen in das Plasmid eingeführt werden. Bevorzugt als Expressionskontrollsequenz in der vorliegenden Erfindung ist diejenige des Tryptophanoperons ( $trp$  po) sowohl von *Serratia marcescens* als auch aus *E. coli* und der alkalische Phosphatase-Promotor bzw. deren Hybrid.

Neben diesen besonders gebräuchlichen Promotoren sind auch andere mikrobielle Promotoren entwickelt und benutzt worden. Die Gen-Sequenz für die erfindungsgemäßen Proteine kann beispielsweise unter der Kontrolle des Leftward-Promotors des Bacteriophagen Lambda ( $P_L$ ) eingesetzt werden. Dieser Promotor ist ein besonders effektiver steuerbarer Promotor. Die Steuerung wird möglich durch den

Lambda-Repressor, von dem benachbarte Restriktionsschnittstellen bekannt sind. Ein temperaturempfindliches Allel dieses Repressor-Gens kann in einen Vektor, der eine protein-Gen-Sequenz enthält, eingefügt werden. Wird die Temperatur auf 42°C erhöht, wird der Repressor inaktiviert und der Promotor aktiviert. Durch die Verwendung dieses Systems ist es möglich, eine Clon-Bank zu etablieren, in der eine funktionelle Protein-Gen-Sequenz in Nahbarschaft zu einer Ribosom-Bindungsstelle in variierenden Abständen zu dem Lambda-P<sub>L</sub>-Promotor plaziert wird. Diese Klone können dann überprüft und der mit der höchsten Ausbeute selektiert werden.

Die Expression und Translation einer Sequenz codierend für die erfindungsgemäßen Proteine kann auch unter Kontrolle anderer Regulationssysteme, die als "homolog" zu dem Organismus in seiner untransformierten Form gelten können, ablaufen. So enthält z.B. chromosomale DNA von einem Lactose-abhängigen E.coli ein Lactose oder Lac-Operon, das durch Ausschüttung des Enzyms Beta-Galactosidase den Lactose-Abbau ermöglicht.

Die Lac-Kontrollelemente können aus dem Bacteriophagen Lambda-plac5, der infektiös für E. coli ist, erhalten werden. Das Lac-Operon des Phagen kann durch Transduktion aus derselben Bakterien-Spezies stammen.

Regulationssysteme, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren Verwendung finden können, können auch aus plasmidischer DNA stammen, die dem Organismus eigen ist. Das Lac-Promotor-Operator-System kann durch IPTG induziert werden.

Andere Promotor-Operator-Systeme oder Teile hiervon können genauso gut verwendet werden: beispielsweise Colicine E<sub>1</sub>-Operator, Galactose-Operator, Xylose-A-Operator, tac- Promotor u.ä..

Zusätzlich zu Prokaryoten können auch eukaryotische Mikroorganismen, wie Hefekulturen verwendet werden. *Saccharomyces cerevisiae* ist die am meisten verwendete von den eukaryotischen Mikroorganismen, obwohl eine Anzahl anderer Spezies allgemein erhältlich ist.

Zur Replikation und Expression in Hefe geeignete Vektoren enthalten einen Hefe-Replikationsstart und einen selektiven genetischen Marker für Hefe. Hybridvektoren, die einen Hefe-Replikationsstart enthalten, z.B. das chromosomale autonom replizierende Segment (ars), bleiben nach der Transformation innerhalb der Hefezelle extra-chromosomal erhalten und werden bei der Mitose autonom repliziert. Zur Expression in *Saccharomyces* wird beispielsweise das Plasmid YRp7 (Stinchcomb et al. Natur 282, 39 (1979); Kingsman et al., Gene 7, 141 (1979); Tschumper et al., Gene 10, 157 (1980)) und das Plasmid YEp13 (Bwach et al., Gene 8, 121-133 (1979)) verwendet. Das Plasmid YRp7 enthält das TRP1-Gen, das eine Selektionierungsmarkierung für eine Hefemutante, die unfähig ist, in tryptophanfreiem Medium zu wachsen, bereitstellt; beispielsweise ATCC Nr. 44076.

Das Vorhandensein des TRP1 Schadens als Charakteristikum des Hefe-Wirts Genoms stellt dann ein wirksames Hilfsmittel dar, um transformation nachzuweisen, wenn ohne Tryptophan kultiviert wird. Ganz ähnlich verhält es sich bei dem Plasmid YEp13, das das Hefe-Gen LEU 2, das zur Ergänzung einer LEU-2-minus-Mutante verwendet werden kann, enthält.

Weitere geeignete Markierungsgene für Hefe sind im Fall von auxotrophen Hefemutanten, im allgemeinen Gene, die Wirtsdefekte komplementieren. Entsprechende Gene sorgen für Prototrophie in einer auxotrophen Hefemutante, z.B. das URA3- und HIS3- Gen. Vorzugsweise enthalten Hefe-Hybridvektoren weiterhin einen Replikationsstart und ein Markierungsgen für einen bakteriellen Wirt, insbesondere E.coli, damit die Konstruktion und die Klonierung der Hybridvektoren und ihrer Vorstufen in einem bakteriellen Wirt erfolgen kann. Weitere für die Expression in Hefe geeignete Expressionskontrollsequenzen sind beispielsweise diejenigen des PHO3- oder PHO5-Gens, ferner in glykolytischen Abbau involvierte Promotor, z.B. der PGK- und GAPDH-Promotor.

Andere geeignete Promotor-Sequenzen für Hefe-Vektoren beinhalten die 5'-flankierende Region der Gene des ADH I (Ammerer G., Methods of Enzymology 101, 192-201 (1983)), 3-Phosphoglycerate-Kinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980)) oder andere glykolytische Enzyme (Kawaski und Fraenkel, BBRC 108, 1107-1112 (1982)) wie Enolase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvat-Decarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, Phosphoglucose-Isomerase und Glucokinase. Bei der Konstruktion geeigneter Expressionsplasmide können die mit diesen Genen assoziierten Terminationssequenzen ebenfalls in den Expressions-Vektor am 3'-Ende der zu exprimierenden Sequenz eingesetzt werden, um Polyadenylierung und Termination der mRNA zu ermöglichen.

Andere Promotoren, die zudem noch den Vorteil der durch Wachstumsbedingungen kontrollierten Transkription besitzen, sind die Promotor-Regionen der Gene für Alkohol-Dehydrogenase-2, Isocytochrom C, Saure-Phosphatase, abbauende Enzyme, die mit dem Stickstoff-Metabolismus gekoppelt sind, die oben erwähnte Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Enzyme, die für die Verarbeitung von Maltose und Galaktose verantwortlich sind. Promotoren, die durch den Hefe Mating Typ Locus reguliert werden, beispielsweise Promotoren der Gene BARI, MF $\alpha$ 1, STE2, STE3, STE5 können bei temperaturregulierten



Systemen durch die Verwendung von temperaturabhängigen sir Mutationen eingesetzt werden. (Rhine Ph.D. Thesis, University of Oregon, Eugene, Oregon (1979), Herskowitz and Oshima, The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, part I, 181-209 (1981), Cold Spring Harbor Laboratory). Diese Mutationen beeinflussen die Expression der ruhenden Mating-Typ Kassetten von Hefen und dadurch indirekt die Mating-Typ abhängigen Promotoren. Generell ist jedoch jeder Plasmid Vektor, der einen Hefe-kompatiblen Promotor, originäre Replikations- und Terminationssequenzen enthält, geeignet.

So können auch Hybridvektoren, die der Hefe-2 $\mu$ -Plasmid-DNA homologe Sequenzen enthalten, verwendet werden. Solche Hybridvektoren werden durch Rekombination innerhalb der Zelle bereits vorhandenen 2 $\mu$ -Plasmiden einverleibt oder replizieren autonom. 2 $\mu$ -Sequenzen sind besonders für Plasmide mit großer Transformationshäufigkeit geeignet und gestatten eine hohe Kopienzahl.

Zusätzlich zu Mikroorganismen sind Zellkulturen multizellulärer Organismen ebenfalls geeignete Wirtssysteme. Im Prinzip ist jede dieser Zellkulturen einsetzbar, ob von Wirbeltier- oder wirbellosen Tierzellkulturen. Größtes Interesse besteht jedoch an Wirbeltierzellen, so daß die Vermehrung von Wirbeltierzellen in Kultur (Gewebe-Kultur) in den letzten Jahren zu einer routinemäßigen Methode wurde (Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, Editors (1973)). Beispiele solch nützlicher Wirtszelllinien sind VERO- und HeLa-Zellen, CHO-Zellen und WI38; BHK, COS-7 und MDCK-Zelllinien. Expressionsvektoren für diese Zellen enthalten üblicherweise (wenn nötig) einen Replikationsstartpunkt, einen Promotor, der vor dem zu exprimierenden Gen lokalisiert ist, gemeinsam mit allen notwendigen Ribosomenbindungsstellen, RNA-Splicing-Stelle, Polyadenylierungsstelle und transkriptionelle Terminations-Sequenzen.

Bei der Verwendung in Säugetierzellen stammen die Kontrollfunktionen auf den Expressions-Vektoren oftmals aus viralem Material. Beispielsweise stammen die üblicherweise verwendeten Promotoren aus Polyoma-, Adenovirus 2, und besonders häufig aus Simian Virus 40 (SV 40). Die frühen und späten Promotoren des SV 40 sind besonders nützlich, da beide leicht aus dem Virus als Fragment zu erhalten sind, das auch noch die virale Replikationsstelle des SV 40 enthält. (Fiers et al., Nature 273, 113 (1978)).

Auch können kleinere oder größere Fragmente des SV 40 verwendet werden, vorausgesetzt, sie enthalten die annähernd 250-bp lange Sequenz, die von der HindIII Schnittstelle bis zur BglII Schnittstelle in dem viralen Replikationsstartpunkt reicht. Außerdem ist es ebenfalls möglich und oft empfehlenswert, Promotor- oder Kontroll-Sequenzen zu verwenden, die normalerweise mit den gewünschten Gensequenzen verknüpft sind, vorausgesetzt, diese Kontroll-Sequenzen sind kompatibel zu den Wirtszellsystemen.

Ein Replikationsstartpunkt kann entweder durch entsprechende Vektorkonstruktion vorgesehen werden, um einen exogenen Startpunkt einzubauen, beispielsweise aus SV 40 oder anderen viralen Quellen (z.B. Polyoma, Adeno, VSV, PBV, etc.) oder kann durch die chromosomalen Replikationsmechanismen der Wirtszelle vorgesehen werden. Wird der Vektor in das Wirtszellenchromosom integriert, reicht die zuletzt genannte Maßnahme meistens aus.

Insbesondere betrifft die Erfindung zur Replikation und phänotypischen Selektionen befähigte Expressionsvektoren, welche eine Expressionskontrollsequenz und eine für die Aminosäuresequenz von VAC kodierende DNA-Sequenz enthalten, wobei besagte DNA-Sequenz mitsamt Transkriptionsstartsignal und -terminationssignal sowie Translationsstartsignal und -stoppsignal in besagtem Expressionsplasmid unter Regulation besagter Expressionskontrollsequenz so angeordnet ist, daß in einer mit besagtem Expressionsplasmid transformierten Wirtszelle VAC exprimiert wird.

Um eine effektive Expression zu erreichen, muß das VAC-Gen richtig (in "Phase") mit der Expressionskontrollsequenz angeordnet sein. Es ist vorteilhaft, die Expressionskontrollsequenz in den Bereich zwischen dem Haupt-mRNA-Start und dem ATG der Genkodiersequenz, welche natürlich mit dem Expressionskontrollsequenz verknüpft ist (z.B. die  $\beta$ -lac-Kodiersequenz bei Verwendung des  $\beta$ -lac-Promotors), mit dem VAC-Gen, welches vorzugsweise sein eigenes Translationsstartsignal (ATG) und Translationsstoppsignal (z.B. TAG) mitbringt, zu verknüpfen. Dadurch wird eine effektive Transkription und Translation gewährleistet.

Beispielsweise wird ein Vektor, insbesondere pBR322, mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten und, gegebenenfalls nach Modifikation des so gebildeten linearisierten Vektors, eine mit entsprechenden Restriktionsenden versehene Expressionskontrollsequenz eingeführt. Die Expressionskontrollsequenz enthält am 3'-Ende (in Translationsrichtung) die Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease, so daß der die Expressionskontrollsequenz bereits enthaltende Vektor mit besagtem Restriktionsenzym verdaut und das mit passenden Enden versehene VAC-Gen eingesetzt werden kann. Dabei entsteht ein Gemisch von zwei Hybridplasmiden, welche das Gen in richtiger bzw. in falscher Orientierung enthalten. Vorteilhaft ist es, den die Expressionskontrollsequenz bereits enthaltenden Vektor noch mit einer zweiten Restriktionsendonuklease innerhalb der Vektor-DNA zu spalten und in das entstandenen Vektor-Fragment das mit richtigen Enden versehene VAC-Gen einzusetzen. Alle Operationen am Vektor erfolgen vorzugsweise in einer Weise, daß die Funktion des Replicons und zumindest eines Markierungsgens nicht beeinträchtigt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein von pBR322 abgeleiteter



Vektor, welcher eine Expressionskontrollsequenz, insbesondere diejenige vom Tryptophan-Operon (*trp po*), enthält, die am 3'-Ende (zwischen dem Haupt-mRNA-Start und dem ersten ATG) die Erkennungssequenz für eine, vorzugsweise kohäsive Enden bildende, Restriktionsendonuclease, z.B. *EcoRI*, trägt, mit der genannten Restriktionsendonuclease und im Vektor-DNA-Teil mit einer zweiten Restriktionsendonuclease, welche flache oder bevorzugt kohäsive Enden bildet, z.B. *BamHI*, verdaut, wonach der so linearisierte Vektor mit der entsprechende Enden aufweisenden VAC-DNA (z.B. mit einem *EcoRI*-Ende vor dem ATG-Start und einem *BamHI*-Ende nach dem Translationsstop-Codon) verknüpft wird. Die Verknüpfung erfolgt in bekannter Weise durch Paarung der komplementären (kohäsiven) Enden und Ligierung, z.B. mit *T<sub>4</sub>*-DNA-Ligase.

Vorzugsweise können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen auch in dem Expressionsplasmid pER103 (E. Rastl-Dworkin et al., *Gene* 21, 237-248 (1983) und EP-A-0.115-613 - hinterlegt bei der DSM unter der Nummer DSM 2773 am 20. Dezember 1983), in dem Plasmid parpER33 (EP-A-0.115-613) oder dem Plasmid pRH100 exprimiert werden, da diese Vektoren alle Regulationselemente enthalten, die zu einer hohen Expressionsrate der klonierten Gene führen.

Erfindungsgemäß wird als Expressionsvektor für das synthetische Protein Gen das Plasmid pRH100 verwendet, das den regulierbaren Tryptophanpromotor aus *Serratia marcescens* und eine artifizielle Ribosomenbindungsstelle enthält. Zur Herstellung des Expressionsplasmides pRH100 wurde das Plasmid pER103 (Eva Dworkin-Rastl et al., *Gene* 21 (1983) 237-248, EP-A-0.115-613) mit der Restriktionsendonuclease *HindIII* linearisiert und die Oligonukleotidsequenz

```

5'      AGCTTAAAGATGAGCTCATCTTTA      3'
3'      ATTTCTACTCGAGTAGAAATTCGA      5'

```

eingefügt.

Die über den mRNA-Weg, aus genomischer DNA oder synthetisch gewonnene, mit entsprechenden (insbesondere *EcoRI*- und *BamHI*-) Enden versehene VAC-DNA kann vor dem Einbringen in ein Expressionsplasmid auch in einen Vektor, z.B. pBR322, kloniert werden, um größere Mengen an VAC-DNA, beispielsweise für die Sequenzanalyse, zu gewinnen. Die Isolierung der Klone, welche das Hybridplasmid enthalten, wird beispielsweise mit einer VAC-DNA spezifischen, radioaktiv-markierten Oligonucleotid-Probe (siehe oben) durchgeführt. Die Charakterisierung der VAC-DNA erfolgt beispielsweise nach dem Verfahren von Maxam und Gilbert (11).

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Teilstücke der VAC-DNA synthetisiert. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von transformierten Wirtszellen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Wirtszelle mit einem Expressionsvektor, der eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für die Aminosäuresequenz von VAC kodierende DNA-Sequenz enthält, transformiert.

Geeignete Wirtszellen sind beispielsweise die oben genannten Mikroorganismen, wie Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* und insbesondere *Escherichia coli*. Die Transformation mit dem erfindungsgemäßen Expressionsplasmiden erfolgt beispielsweise wie in der Literatur beschrieben, so für *S. cerevisiae* (12), *B. subtilis* (13) und *E. coli* (14). Die Isolierung der transformierten Wirtszellen erfolgt vorteilhaft aus einem selektiven Nährmedium, dem das Biocid zugesetzt wird, gegen welches das im Expressionsplasmid enthaltende Markierungs-Gen Resistenz verleiht. Wenn, wie bevorzugt, die Expressionsplasmide das *amp<sup>r</sup>*-Gen enthalten, wird dem Nährmedium demgemäß Ampicillin zugesetzt. Zellen, welche das Expressionsplasmid nicht enthalten, werden in einem solchen Medium abgetötet.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die auf dem genannten Weg erhältlichen transformierten Wirtszellen.

Die transformierten Wirtszellen können zur Herstellung von Verbindungen mit VAC-Aktivität verwendet werden. Das Verfahren zur Herstellung dieser Verbindung ist dadurch gekennzeichnet, daß die transformierten Wirtszellen kultiviert und das Produkt aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird.

Die Erfindung betrifft daher vor allem ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen mit VAC-Aktivität und von Salzen solcher Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß mit einem Expressionsplasmid, welches eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für die Aminosäuresequenz von VAC kodierende DNA-Sequenz enthält, transformierte Wirtszellen in einem flüssigen Nährmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, kultiviert werden und das Produkt aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird, und, falls erforderlich, ein verfahrensgemäß erhältliches Produkt mit einem zur Aufspaltung der Disulfidbindungen geeigneten Reduktionsmittel versetzt und das erhältliche reduzierte Polypeptid gegebenenfalls mit einem zur Neuknüpfung von Disulfidbindungen geeigneten Oxidationsmittel behandelt wird, und gewünschtenfalls, eine erhältliche VAC-Verbindung in eine andere VAC-

Verbindung überführt wird, ein verfahrensgemäß erhältliches Gemisch von Verbindungen mit VAC-Aktivität in die einzelnen Komponenten aufgetrennt wird und/oder, gewünschtenfalls, ein erhaltenes Salz in das Polypeptid und ein erhaltenes Polypeptid in das entsprechende Salz desselben überführt wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von VAC-Verbindungen.

Die Kultivierung der erfindungsgemäßen Transformierten Wirtszellen erfolgt in an sich bekannter Weise. So können für die Kultivierung der erfindungsgemäßen, transformierten Wirtsmikroorganismen verschiedene Kohlenstoffquellen verwendet werden. Beispiele bevorzugter Kohlenstoffquellen sind assimilierbare Kohlenhydrate, wie Glucose, Maltose, Mannit oder Lactose, oder ein Acetat, das entweder allein oder in geeigneten Gemischen verwendet werden kann. Geeignete Stickstoffquellen sind beispielsweise Aminosäuren, wie Casamino-säuren, Peptide und Proteine und ihre Abbauprodukte, wie Trypton, Pepton oder Fleischextrakte; weiterhin Hefeextrakte, Malzextrakt, wie auch Ammoniumsalze, z.B. Ammoniumchlorid, -sulfat oder -nitrat, die entweder allein oder in geeigneten Mischungen verwendet werden können. Anorganische Salze, die ebenfalls verwendet werden können, sind z.B. Sulfate, Chloride, Phosphate und Carbonate von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium.

Weiterhin enthält das Medium z.B. wachstumsfördernde Substanzen, wie Spurenelemente, z.B. Eisen, Zink, Mangan und dergleichen, und vorzugsweise Substanzen, die einen Selektionsdruck ausüben und das Wachstum von Zellen, die das Expressionsplasmid verloren haben, verhindern. So wird dem Medium beispielsweise Ampicillin zugesetzt, wenn das Expressionsplasmid ein  $amp^R$ -Gen enthält. Ein solcher Zusatz von antibiotisch wirksamen Substanzen bewirkt auch, daß kontaminierende, Antibiotika-empfindliche Mikroorganismen abgetötet werden.

Die Kultivierungsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert des Mediums und Fermentationszeit, werden so ausgewählt, daß maximale VAC-Titer erhalten werden. So wird ein *E. coli*- oder ein Hefe-Stamm bevorzugt unter aeroben Bedingungen in submerser Kultur unter Schütteln oder Rühren bei einer Temperatur von etwa 20 bis 40 °C, vorzugsweise etwa 30 °C, und einem pH-Wert von 4 bis 9, (vorzugsweise etwa 30 °C, und einem pH-Wert von 4 bis 9), vorzugsweise bei pH 7, während etwa 4 bis 20h, vorzugsweise 8 bis 12h, kultiviert. Dabei sammelt sich das Expressionsprodukt intrazellulär an.

Wenn die Zelldichte einen ausreichenden Wert erreicht hat, wird die Kultivierung abgebrochen und das Produkt, falls erforderlich, aus den Zellen des Mikroorganismus freigesetzt. Zu diesem Zweck werden die Zellen zerstört, z.B. durch Behandlung mit einem Detergens, wie SDS oder Triton, oder mit Lysozym oder einem gleichartig wirkenden Enzym lysiert. Alternativ oder zusätzlich kann man mechanische Kräfte, wie Scherkräfte (z.B. X-Press, French-Press, Dyno-Mill) oder Schütteln mit Glasperlen oder Aluminiumoxid, oder abwechselndes Einfrieren, z.B. in flüssigem Stickstoff, und Auftauen, z.B. auf 30 ° bis 40 °C, sowie Ultraschall zum Brechen der Zellen anwenden. Die resultierende Mischung, die Proteine, Nucleinsäuren und andere Zellbestandteile enthält, wird nach der Zentrifugation in an sich bekannter Weise an Proteinen angereichert. So wird z.B. der größte Teil der Nicht-Protein-Bestandteile durch Polyäthylenimin-Behandlung abgetrennt und die Proteine einschließlich der VAC-Verbindungen z.B. durch Sättigen der Lösung mit Ammoniumsulfat oder mit anderen Salzen ausgefällt. Weitere Reinigungsschritte umfassen beispielsweise chromatographische Verfahren, wie Ionenaustauschchromatographie, HPLC, Reverse-Phase-HPLC und dergleichen. So erfolgt die Auftrennung der Mischbestandteile durch Dialyse, nach Ladung mittels Gel- oder trägerfreier Elektrophorese, nach Molekülgröße mittels einer geeigneten Sephadex-Säule, durch Affinitätschromatographie, z.B. mit Antikörpern, insbesondere monoklonalen Antikörpern, oder mit Thrombin gekuppelt an einen geeigneten Träger zur Affinitätschromatographie, oder durch weitere, insbesondere aus der Literatur bekannte Verfahren.

Beispielsweise umfaßt die Isolierung der exprimierten VAC-Verbindungen die folgenden Stufen. Abtrennung der Zellen aus der Kulturlösung mittels Zentrifugation; Herstellung eines Rohextraktes durch Zerstören der Zellen, z.B. durch Behandlung mit einem lysierenden Enzym und/oder abwechselndem Einfrieren und Wiederauftauen; Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile; Ausfällen der DNA durch Zugabe von Polyäthylenimin; Fällung der Proteine durch Ammoniumsulfat; Affinitätschromatographie des gelösten Niederschlags an einer monoklonalen Anti-VAC-Antikörper-Säule; Entsalzung der so gewonnenen Lösung mittels Dialyse oder Chromatographie an Sephadex G25 oder Sephadex G10.

Weitere Reinigungsschritte schließen Gelfiltrationen an Sephadex G50 (oder G75) und Reverse-Phase-HPLC ein. Entsalzung wieder an Sephadex G25.

Zum Nachweis der VAC-Aktivität kann der Test mit Anti-VAC-Antikörpern (z.B. aus Kaninchen/Maus erhältlich, oder aus Hybridomazellen erhältlich monoklonale Antikörper) oder können die in der EPA 0 181 465 beschriebenen Tests herangezogen werden.

Wie bereits erwähnt, ist der alkalische Phosphatasepromotor besonders geeignet für die Expression der erfindungsgemäßen Proteine.

Das Gen für die alkalische Phosphatase (PhoA) aus *E. coli* unterliegt einer strengen Regulation. In

Gegenwart von Phosphat wird das Gen komplett abgeschaltet, bei Abwesenheit von Phosphat im Medium erfolgt Genexpression. H.Shuttleworth et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986), p.8689 sowie C.N.Chang et al., Gene 44 (1986), pp.121-125 beschreiben die Nukleotidsequenz dieses Gens. Zur Konstruktion eines geeigneten Expressionsvektors wurde aus mehreren Oligonukleotiden die Promotorregion des PhoA Gens zusammengesetzt und in EcoRI-ClaI geschnittenes pAT153 (Amersham) eingesetzt. Vor der ribosomalen Bindungsstelle wurde eine XhoI Stelle eingeführt. Die originale EcoRI Stelle wird beim Einligieren des synthetischen DNA-Fragmentes zerstört. Nach der ribosomalen Bindungsstelle wurde ein Translationsstart-ATG vorgesehen, dessen G das erste Nukleotid einer SacI (= SstI) Stelle ist. Der Expressionsvektor läßt sich durch Schnitt mit SacI an dieser Stelle linearisieren und der 3'Überhang durch Behandlung mit DNA-Polymerase I - Klenow Fragment in Gegenwart von dGTP in ein gerades Ende überführen. Dadurch kann jedes beliebige Gen an dieser Stelle eingefügt werden, für korrekte Expression muß es mit der ersten Base der kodierenden Region beginnen.

Das HindIII-SalI Fragment des pAT-Anteils wurde entfernt und durch den alkalischen Phosphatase-Transkriptionsterminator ersetzt. Die originale SalI Stelle wurde zerstört. Dafür wurde sie vor dem Terminator zusammen mit der ebenfalls aus pAT153 deletierten BamHI Stelle wieder eingebracht.

Die Sequenz der synthetisch hergestellten DNA ist in Fig.15 abgebildet. Der resultierende Vektor wurde pRH284T genannt.

Zur Herstellung eines Vektors, der zur Expression von VAC-alfa geeignet ist, wurde in den pRH284T ein für VAC-alfa kodierendes DNA Molekül eingefügt. Hierzu wurde beispielsweise der cDNA Klon pP6/5 mit BglII und PstI geschnitten und das 980 bp lange Fragment isoliert, das den Hauptteil der klonierenden und ca. 200 bp 3'nichttranslatierte Region enthält. Mittels Oligonukleotiden wurde das fehlende 5'Ende der kodierenden Region ersetzt. Dabei wurde durch zwei Mutationen (GGC → GGT, Gly-7 und ACT → ACC, Thr-8) gleichzeitig eine KpnI-Schnittstelle in die VAC-cDNA eingeführt.

Die Oligonukleotide hatten folgendes Aussehen:

```

      | EBI-678                                     | | EBI-677
5'   GCACAGGTTCTCAGAGGTACCGTGACTGACTTCCCTGGATTTGATGAGCGGGCT
30   CGTGTCCAAGAGTCTCCATGGCACTGACTGAAGGGACCTAACTACTCGCCCCGA
      |                                     EBI-680 | |

35   GATGCAGAACTCTTCGGAAGGCTATGAAAGGCTTGGGCACAGATGAGGAGAGC
      CTACGTCTTTGAGAAGCCTTCCGATACTTCCGAACCCGTGTCTACTCCTCTCG
                                     EBI-

40   | | EBI-682                                     |
      ATCCTGACTCTGTTGACATCCCGAAGTAATGCTCAGCGCCAGGAAATCTCTGCA 3'
      TAGGACTGAGACAACTGTAGGGCTTCATTACGAGTCGCGGTCCTTTAGAG      5'
45   679 | |                                     EBI-681 |

```

Der so hergestellte Vektor wurde pRH291 genannt (Fig. 16).

Zur Expression von VAC-beta wurde vorzugsweise als Expressionsvektor das Plasmid pER103 verwendet (E.Rastl-Dworkin et al., Gene 21 (1983), 237-248). Der Vektor wurde mit HindIII linearisiert. Das 5'überhängende Ende wurde mit dATP und DNA-Polymerase I / Klenowfragment partiell eingefüllt, und der verbleibende Einzelstrangrest mit S1 Nuklease verdaut. Der Vektor wurde mit BamHI nachgeschnitten und das große Fragment isoliert (Fig.17). In den so vorbereiteten Vektor wurde das für VAC-beta kodierende DNA-Molekül ligiert. Hierzu wurde beispielsweise aus dem Klon pRH203 das 440 bp lange MaeIII-BamHI Fragment isoliert, das die Codons 13 bis 157 enthält. Das fehlende 5'Ende wurde durch Oligonukleotide ergänzt:

## EBI-307

5' CCATGGCTTGGTGGAAAGCTTGGATCGAACAGGAAGGT 3'  
 3' GGTACCGAACCACCTTTTGAACCTAGCTTGTCCTTCCACAGTG 5' EBI-306

Dabei wurden für E.coli optimale Codons verwendet (zB. R.Grantham et al., Nucleic Acids Res. 8 (1980), 1893-1912). Dieser Codonaustausch resultierte in einer neuen HindIII-Stelle bei Codon 5 bis 7. Nach dem Nachschnitt mit BamHI wurde das 5'terminale VAC-Fragment in den vorbereiteten pER103 Vektor ligiert. Der entstehende Vektor wurde pRH211 benannt. Um die für VAC-beta kodierende Region zu ergänzen, wurde aus dem Klon pRH201 das 1230 bp lange BamHI-SphI Fragment isoliert. Der ca. 200 bp lange pBR322 Abschnitt von BamHI bis SphI aus dem Plasmid pRH211 wurde entfernt und durch den entsprechenden VAC-cDNA Teil ersetzt. Es resultierte der Vektor pRH212. Das EcoRI-BamHI Fragment, das den Trp-Promotor (*S.marcescens*), die ribosomale Bindungsstelle und den synthetisch hergestellten Beginn des VAC-beta Gens enthält, wurde durch Sequenzieren überprüft. Der Nachweis des plasmidkodierten VAC-beta erfolgte im Maxizell-system (A.Sancar et al., J. Bacteriol. 137 (1979), pp.692-693.).

Besonders bevorzugt für die Expression des VAC-beta ist die Konstruktion eines Expressionsvektors ausgehend von pRH284T. Hierzu wurde in den Expressionsvektor in geeigneter Weise das für VAC-beta kodierende Insert ligiert. Als Ausgangsmaterial für dieses Insert kann beispielsweise der Vektor pRH212 dienen:

Der Expressionsvektor pRH284T wurde mit SacI linearisiert und die 3' überhängenden Ende mit DNA-Polymerase I / Klenowfragment und dGTP in gerade Enden übergeführt. Der Vektor wurde mit Sall nachgeschnitten, und das große Fragment isoliert. Das HindIII-Sall Insert des Klons pRH212 wurde isoliert. Das Oligonukleotidpaar

5' GCTTGGTGGAA 3' EBI-684  
 3' CGAACCACCTTTTGA 5' EBI-685

wurde mit dem VAC-beta Insert und dem vorbereiteten pRH284T ligiert. E.coli HB101 wurde mit der Ligaselösung transformiert. Der resultierende Klon wurde pRH292 benannt (Fig.18).

Da in den Expressionsvektoren pRH291 (VAC-alpha) und pRH292 (VAC-beta) das Tetracyclinresistenzgen vom Promotor bis zur Sall-Stelle deletiert worden ist, können diese Vektoren keine Tetracyclinresistenz vermitteln. Tetracyclin-resistente Expressionsvektoren erhält man beispielsweise durch die Konstruktion nach dem Schema in Fig. 36. VAC-alpha und VAC-beta cDNA weisen jeweils in der 3' nicht translatierten Region eine SphI Stelle auf. Im beta-Lactamase Gen des Vektors findet sich eine PvuI Stelle. Beide Erkennungssequenzen sind singulär. Daher kann durch Schnitt mit PvuI und SphI ein Teil des beta-Lactamase-Gens, der phoA-Promotor und die den gesamten kodierenden Teil der VAC-alpha oder -beta plus etwas 3' nicht translatierter cDNA aus den beiden Expressionsvektoren freigesetzt werden. Andererseits kann aus dem Plasmid pAT153 durch Schnitt mit PvuI und EcoRI der Rest des beta-Lactamase Gens, der Replikationsursprung und das gesamte Tetracyclinresistenzgen inklusive des Promotors freigesetzt werden. Werden die SphI- bzw. EcoRI Enden durch enzymatische Behandlung gerade gemacht, erhält man hier kompatible Enden. Werden nun Vektor-Fragment und das VAC-alpha oder VAC-beta cDNA enthaltende Fragment ligiert, entstehen Expressionsvektoren, die das komplette Tetracyclin enthalten: pGN25 (VAC alpha), pGN26 (VAC-beta).

Kompetente Wirtsorganismen, beispielsweise E.coli, besonders bevorzugt E.coli HB101 wurden mit den so hergestellten Expressionsvektoren transformiert und in geeigneten Medien kultiviert.

Ein für die Expression von VAC-alfa und VAC-beta gut geeignetes Medium sei im folgenden mit seinen Komponenten angeführt.

0,2 - 2,0 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 0,1 - 1,5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O  
 0,1 - 5 g/l KCl  
 0,1 - 10 g/l NaCl  
 0 - 5 g/l NH<sub>4</sub>Cl  
 0,1 - 5 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
 0,001 - 0,1 g/l CaCl<sub>2</sub>  
 1 - 50 mg/l Thiamin.HCl  
 0,5 - 100 mg/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

- 0,1 - 5 mg/l  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
 0,1 - 10 mg/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
 0,2 - 5 mg/l  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$   
 0,1 - 5 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   
 5 0,05 - 1 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
 0,1 - 5 mg/l  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   
 0,1 - 5 mg/l  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
 0,1 - 5 mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
 0,1 - 5 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 10 10 - 30 g/l Caseinhydrolysat (Merck Art.# 2238)  
 0 - 100 g/l Caseinhydrolysat (Sigma C9386)  
 0,10 - 1 mg/l Cystein  
 0 - 10 g/l Hefeextrakt (Difco)  
 0 - 2 g/l Citronensäure  
 15 0 - 50 g/l Glucose (Start)  
 5 - 50 g/l Glucose (Zufütterung während der Fermentation)  
 Besonders geeignet ist das Medium der Zusammensetzung:

20 Medien: 1) Vorkultur

- 10 g/l Trypton  
 5 g/l Hefeextrakt  
 25 4 g/l Glucose  
 9 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
 1 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
 1 g/l KCl  
 1 ml/l 1M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 30 100 mg/l Ampicillin  
 Start-pH = 7,2

35 2) Hauptkultur

- 0,68 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$   
 0,62 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$   
 2,33 g/l KCl  
 40 0,5 g/l NaCl  
 0,53 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
 1,23 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 0,011 g/l  $\text{CaCl}_2$   
 10 mg/l Thiamin.HCl  
 45 3,92 mg/l  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
 0,72 mg/l  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
 0,71 mg/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
 1,5 mg/l  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$   
 0,75 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   
 50 0,19 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
 0,51 mg/l  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   
 0,79 mg/l  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
 0,73 mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
 0,86 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 55 21 g/l Caseinhydrolysat (Merck Art.# 2238)  
 25 g/l Caseinhydrolysat (Sigma C9386)  
 100 mg/l Cystein  
 2 g/l Hefeextrakt

1 g/l Citronensäure

11 g/l Glucose.H<sub>2</sub>O (Start bzw. Feed)

Zur Fermentation wurde beispielsweise das Vorkulturmedium mit E.coli, transformiert mit dem entsprechenden Expressionsvektor, angeimpft und unter Rühren und Sauerstoffzufuhr inkubiert. Ein Teil dieser Vorkultur wurde dann in einen Fermenter mit dem Hauptkulturmedium überführt und unter Rühren und Belüften kultiviert. Während der Fermentationszeit wurde die Glucosekonzentration und der Sauerstoffpartialdruck beobachtet und entsprechend optimiert. Nach etwa 20 Stunden Fermentationszeit wurde der Ansatz abgekühlt, das Nährmedium von der Biomasse abgetrennt und eingefroren.

Der Nachweis der exprimierten Proteine erfolgte beispielsweise durch Western Blot. Das Ergebnis ist in Fig. 19 weitergegeben.

" + Phosphat" ist die Kontrolle ohne Expression, "-Phosphat" zeigt die Expression von VAC-alfa (Klon HB101/pRH291) bzw. VAC-beta (Klon HB101/pRH292) Protein unter der Kontrolle des alkalischen Phosphatase Promotors. Sowohl VAC-alfa als auch VAC-beta Protein sind bereits auf dem gefärbten Gel zu erkennen. Die gebildete Menge an VAC-Proteinen beträgt überraschenderweise mindestens 20 mg/l/OD<sub>600nm</sub> Bakterienkultur.

Der Western Blot zeigt deutlich die angefärbte VAC-alfa Bande. Zusätzlich sind einige Proteine niedrigeren Molekulargewichts im Bereich bis 30 kD erkennbar, die möglicherweise durch proteolytische Spaltung am N-und/oder C-Terminus des VAC-alfa Proteins entstanden sind. Auffällig ist außerdem ein durch das Antiserum erkanntes Protein im Bereich kleiner 20 kD, das ein durch Proteolyse entstandenes Halbmolekül des VAC-alfa Proteins darstellen könnte. Überraschenderweise wurde auch VAC-beta durch Anti-VAC-Antiserum erkannt. Da diese Bande wesentlich schwächer als die VAC-alfa Bande gefärbt ist, andererseits aber die VAC-beta Bande im Coomassie Blau gefärbten Gel in ihrer Intensität dem VAC-alfa entspricht, ist daraus zu schließen, daß die Erkennung des VAC-beta Proteins durch das Anti-VAC-Antiserum wesentlich schlechter als jene des VAC-alfa Proteins erfolgt.

Zur Isolierung und Reinigung der exprimierten Proteine wurde die gefrorene Biomasse in einem geeigneten Lyse-Puffer suspendiert. Die Zellen wurden anschließend mechanisch, beispielsweise durch eine Manton-Gaulin Presse zerstört. Nach Zugabe eines Fällungsmittels für Nicht-Protein-Bestandteile, wie Polyethylenimin, wurden die festen Bestandteile beispielsweise durch Zentrifugation entfernt. Nach Ausfällung der Proteine, vorzugsweise durch Ammoniumsulfatfraktionierung, Auflösung des Präzipitates, Entfernung des Fällungsmittels und Klärung der Lösung wurde der so erhaltene Extrakt verschiedenen chromatographischen Reinigungsschritten unterworfen. Anstelle der Ausfällung der Proteine läßt sich der rohe VAC-Extrakt auch durch eine chromatographische Vorreinigung soweit reinigen, daß er anschließend einem Reinigungszyklus unterworfen werden kann. Als geeignetes Säulenmaterial für die Vorreinigung hat sich beispielsweise SiO<sub>2</sub> herausgestellt, doch sind auch andere Materialien mit ähnlichen Eigenschaften geeignet. Erfindungsgemäß wurde Silica Catalyst, Carrier, Grade 953 W der Firma Grace verwendet. Ein für die Reinigung der erfindungsgemäßen Proteine geeigneter chromatographischer Reinigungszyklus bestand beispielsweise aus einer DEAE-Fast-Flow-Sephacrose-, einer Sephacryl S-200 High Resolution- und einer Q-Sephacrose-Fast-Flow-Chromatographie. Die Reinheit der so erhältlichen erfindungsgemäßen Proteine wurde mittels SDS-PAGE, Western Blot, Gelpermeations HPLC, Reverse HPLC und isoelektrischer Fokussierung bestimmt.

Die für sämtliche Kultivierungs-, Isolierungs- und Reinigungsschritte erforderlichen einzuhaltenden Parameter wie Temperatur, Mengenverhältnisse, Reihenfolge der einzelnen Schritte, pH-Werte, besondere Reagentien etc. sind dem Fachmann bestens bekannt. Die unten angegebenen Beispiele können, falls gewünscht, in geeigneter, dem Fachmann bekannter Weise abgewandelt werden.

Von besonderer Bedeutung ist die Frage, ob ein durch gentechnische Methoden hergestelltes VAC-Protein, im folgenden kurz r-VAC genannt, mit dem aus natürlichem Material erhältlichen VAC-Protein (s. EPA 0 181 465), im folgenden VAC genannt, identisch ist; identisch sowohl in seiner Struktur als auch in seinen biologischen Eigenschaften.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden folgende Methoden verwendet:

1. Gelpermeations-HPLC
2. Reverse Phase HPLC
3. N-terminale Sequenzierung
4. Tryptische Peptid Karte
5. SDS-Gelelektrophorese
6. Western Blot
7. Isoelektrische Fokussierung

Die Gelpermeations-HPLC weist für VAC ein Molekulargewicht von 34.000, für r-VAC von 33.000 auf, was innerhalb der Genauigkeit der Methode als gleichwertig zu betrachten ist. Es ist zu beachten, daß die

verwendete Säule streng genommen nicht nach dem Molekulargewicht sondern nach der Molekülgröße differenziert.

Bei der Reverse Phase HPLC eluieren beide Proteine nach einer Retentionszeit von etwa 29 Minuten.

Die N-terminale Sequenzierung des r-VAC bis zur Aminosäure 39 ergab 100%ige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz. N-terminales Methionin, oft bei gentechnisch hergestellten Proteinen zusätzlich anzutreffen, konnte überraschenderweise nicht nachgewiesen werden. Wie zu erwarten war, liegt der N-Terminus des r-VAC unblockiert vor.

Bei dem Vergleich der tryptischen Fragmentierung ergab sich ein praktisch identisches Peptidmuster.

Auch der Vergleich der beiden Proteine mittels SDS-PAGE zeigte praktisch gleichartiges Verhalten. Beide beinhalten dimere Formen, die offensichtlich über Disulfidbrücken gebunden sind und mit Dithiothreitol reduziert werden können.

Ebenso bestätigte der immunologische Vergleich durch Western Blot die Identität der beiden Proteine.

Der bei der Ermittlung des isoelektrischen Punktes festzustellende Unterschied von +0,1 pH-Einheiten bei r-VAC läßt sich durch den freien N-Terminus erklären.

Zur Überprüfung der biologischen Aktivität des r-VAC wurden verschiedene Koagulationstest durchgeführt und die Ergebnisse mit denen verglichen, die mit VAC aus natürlichem Material erhalten wurden. Alle durchgeführten Tests, der modifizierte Prothrombin Zeit Test, ebenso wie der Thrombin Test, ebenso wie die Faktor X<sub>a</sub>-Generation in Gewebefaktor-aktiviertem Plasma belegen eindeutig, daß r-VAC biologische Aktivität aufweist, und daß diese nicht zu unterscheiden ist von der des VAC aus natürlichem Material.

Die aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz für VAC $\beta$  zeigt eine 54% Homologie zu VAC $\alpha$ . Aufgrund dieses Befundes wurden einige biologische Aktivitäten von VAC $\beta$  mit denen von VAC $\alpha$  verglichen.

1. Der Effekt von VAC $\alpha$  und VAC $\beta$  auf die Prothrombinase-Aktivität: Fig. 47 zeigt, daß beide Proteine VAC $\alpha$  und VAC $\beta$  den gleichen inhibitorischen Effekt auf die Prothrombinase-Aktivität ausüben, was den gleichen Mechanismus für die Koagulationsinhibition vermuten läßt.

2. Phospholipase Inhibitionsaktivität: wie bereits erwähnt, lassen sich VAC $\alpha$  aufgrund ihrer Primärstruktur und VAC $\beta$  in die Familie der Amexine einordnen. (Gusow, M.J. (1987) Festschriften 203, 99-103). Einige andere Mitglieder dieser Familie, z.B. Calpactin I und II haben sich als Phospholipase Inhibitoren herausgestellt. Ihre Aktivität beruht auf einer Calcium-abhängigen Bindung an die Phospholipide wodurch sie den Angriff der Phospholipase auf ihr Substrat blockieren (Davidson et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1698-1705).

Da nun VAC $\alpha$  und VAC $\beta$  Calcium-abhängig an Phospholipide binden, wurde überprüft, ob die beiden Proteine ebenso auch mögliche Antiphospholipase-Aktivitäten aufweisen. Ein Testverfahren mit <sup>3</sup>-H-Ölsäure markiertem E.coli wurde hierzu verwendet.

Die Figuren 48 und 49 zeigen, daß sowohl VAC $\alpha$  als auch VAC $\beta$  Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität inhibieren. Weiterhin sind beide Proteine unter den gewählten Bedingungen gleich aktiv. 50% Inhibition wurde bei ca. 65 mM VAC $\alpha$  oder VAC $\beta$  beobachtet. Verminderung der Substrat Konzentration auf die Hälfte resultierte in einer Reduzierung der ID<sub>50</sub> von VAC auf die Hälfte. Dies ist ein Hinweis darauf, daß VAC auf der Substratebene agiert. Folglich findet VAC wahrscheinlich an die Phospholipidmembranen und inhibiert hierdurch die Phospholipase Aktivität.

Calpactin I bindet an Phospholipidmembranen auf dem mikromolaren Ca<sup>++</sup> Level (Drust, D.S. & Cremitz, C.E. (1988) Nature 331, 88-91). Daher wurde untersucht, ob VAC in der Lage ist, Phospholipase-Aktivität bei geringer Calcium Konzentration zu inhibieren. Da die pankreatische Phospholipase A<sub>2</sub> bei Ca<sup>++</sup> Konzentrationen unter 50 mM inaktiv war, was das die niedrigste verwendete Konzentration. Die Figuren 50 und 51 zeigen die Calcium-Abhängigkeit der VAC induzierten Inhibition der Phospholipase Aktivität. Bei allen Ca<sup>++</sup> Konzentrationen zeigte sowohl VAC $\alpha$  als auch VAC $\beta$  Inhibitor-Aktivitäten. Doch scheint ein funktioneller Unterschied zwischen VAC $\alpha$  als auch VAC $\beta$  Inhibitor-Aktivitäten. Doch scheint ein funktioneller Unterschied zwischen VAC $\alpha$  und VAC $\beta$  zu bestehen. Bei der niedrigsten Ca<sup>++</sup>-Konzentration war VAC $\beta$  signifikant aktiver als VAC $\alpha$ . Dies könnte implizieren, daß VAC $\beta$  weniger Ca<sup>++</sup> zur Membranbindung benötigt.

Verfahrensgemäß erhältliche VAC-Proteine können in an sich bekannter Weise in andere VAC-Proteine (Peptide) überführt werden.

Untersuchungen haben gezeigt, daß Disulfidbrücken für die gerinnungshemmende Aktivität von natürlichem VAC ohne Bedeutung ist. Je nach Wahl der Wirtszelle kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine Verknüpfung der Cystein-Reste im primären Translationsprodukt unter Bildung von Disulfidbrücken in einer Weise erfolgt, die sich vom natürlich ablaufenden Vorgang unterscheidet. Es ist möglich, daß die sich einstellende "falsche" Tertiärstruktur des Produktes eine Verminderung oder sogar den Verlust, evtl. aber auch eine Verbesserung, der wertvollen pharmakologischen Eigenschaften, insbesondere der gerinnung-



shemmenden Aktivität, zur Folge hat, was sich mit Hilfe der oben genannten VAC-Assays feststellen läßt. In einem solchen Fall ist es gegebenenfalls zweckmäßig, die Disulfidbindungen mit einem geeigneten Reduktionsmittel zu spalten und das reduzierte Polypeptid zur Neuknüpfung der Disulfidbindungen mit einem geeigneten Oxidationsmittel zu behandeln: Anhand der VAC-Aktivität des gebildeten Produktes läßt sich feststellen, ob die gewählten Bedingungen (Reduktions- und/oder Oxidationsmittel) zur gewünschten Steigerung der biologischen Aktivität geführt haben oder ob die Bedingungen in bekannter Weise modifiziert werden müssen.

Zur Aufspaltung von Disulfidbrücken geeignete Reduktionsmittel sind beispielsweise Thiol-Verbindungen, wie Thiophenol, 4-Nitrothiophenol, 1,4-Butandithiol und insbesondere 1,4-Dithiothreitol.

Die Reduktion wird vorteilhaft in einem wäßrig-alkalischen Medium, beispielsweise in der verdünnten wässrigen Lösung eines Alkalimetallhydroxids, z.B., Natriumhydroxid, Alkalimetallcarbonats, z.B. Natriumcarbonats, oder einer organischen Base, insbesondere eines Triniederalkylamins, z.B. Triäthylamin, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Oxidationsmittel, welche zur Neuknüpfung von Disulfidbindungen in den reduzierten Polypeptiden geeignet sind, sind beispielsweise Luftsauerstoff, welcher durch eine wässrige Lösung des Polypeptids, der gegebenenfalls eine katalytische Menge eines Übergangsmetallsalzes, z.B. Eisen-(III)-sulfat, Eisen-(III)-chlorid oder Kupfer-(II)-sulfat, beigelegt wurde, geleitet wird; Jod, auch in Form des Kaliumjodid-Adduktes  $KJ_3$ , welches vorzugsweise in alkoholischer, z.B. methanolischer, oder wässrig-alkoholischer, z.B. wässrig-methanolischer Lösung eingesetzt wird; Kaliumhexacyanoferrat-(III) in wässriger Lösung; 1,2-Dijodäthan oder Azodicarbonsäuredimethylester oder -diäthylester, welche in Wasser oder in einer Mischung bestehend aus Wasser und einem mit Wasser mischbaren Alkohol, z.B. Methanol, zur Reaktion gebracht werden. Die Oxidation wird insbesondere bei Raumtemperatur ausgeführt.

Die Abtrennung der Reagentien, insbesondere der Salze und der Oxidations- bzw. der Reduktionsmittel und ihrer Folgeprodukte, von der gewünschten VAC-Verbindung erfolgt nach an sich bekannten Methoden, beispielsweise durch Molekulargewichtsfiltration, z.B. an Sephadex oder Biogel.

Ein verfahrensgemäß erhältliches Gemisch von Verbindungen mit VAC-Aktivität kann in an sich bekannter Weise in die einzelnen Komponenten aufgetrennt werden. Geeignete Trennverfahren sind beispielsweise chromatographische Verfahren, z.B. Adsorptions-Chromatographie, Ionenaustauschchromatographie, HPLC oder Reverse-Phase HPLC, ferner multiplikative Verteilung oder elektrophoretische Methoden, z.B. Elektrophorese an Celluloseacetat oder Gelelektrophorese, insbesondere Polyacrylamid-Gelelektrophorese ("PAGE").

Die erfindungsgemäß herstellbaren Verbindungen können nicht nur in freier Form, sondern auch in Form ihrer Salze, insbesondere ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, vorliegen. Da sie mehrere Aminosäurereste mit freien Aminogruppen enthalten, können die erfindungsgemäßen Verbindungen z.B. in Form von Säureadditionssalzen vorliegen. Als Säureadditionssalze kommen insbesondere physiologisch verträgliche Salze mit üblichen, therapeutisch anwendbaren Säuren in Betracht; als anorganische Säuren sind die Halogenwasserstoffsäuren, wie die Chlorwasserstoffsäure, aber auch Schwefelsäure und Phosphor- bzw. Pyrophosphorsäure zu nennen; als organische Säuren sind in erster Linie Sulfonsäuren, wie die Benzol- oder p-Toluolsulfonsäure oder Niederalkansulfonsäuren, wie Methansulfonsäure, sowie Carbonsäuren, wie Essigsäuren, Milchsäure, Palmitin- und Stearinsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Ascorbinsäure und Citronensäure geeignet. Da die VAC-Verbindungen auch Aminosäurereste mit freien Carboxylgruppen enthalten, können sie auch als Metallsalz, insbesondere als Alkalimetall- oder Erdalkalimetallsalz, z.B. Natrium-, Calcium- oder Magnesiumsalz, oder auch als Ammoniumsalz, abgeleitet von Ammoniak oder einer physiologisch verträglichen, organischen stickstoffhaltigen Base, vorliegen. Da sie aber zugleich freie Carboxylgruppen und freie Aminogruppen enthalten, können sie auch als innere Salz vorliegen.

Je nach Arbeitsweise erhält man die erfindungsgemäßen Verbindungen in freier Form, in Form von Säureadditionssalzen oder Salzen mit Basen. Aus den Säureadditionssalzen und den Salzen mit Basen können in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Einstellen des pH-Wertes auf den isoelektrischen Punkt, die freien Verbindungen gewonnen werden. Von letzteren wiederum lassen sich durch Umsetzen mit Säuren bzw. Basen, z.B. mit solchen, die die oben genannten Salze bilden, und Eindampfen oder Lyophilisieren therapeutisch annehmbare Säureadditionssalze bzw. Salze mit Basen gewinnen.

Die Eigenschaft von Antikörpern, spezifische Antigene zu binden, findet außerhalb des Körpers praktische Anwendung bei der qualitativen und quantitativen Bestimmung (Immuno-Assay) und bei der Reinigung der Antigene (Immunoaffinitätschromatographie). Serum immunisierter Tiere enthält normalerweise eine Vielzahl verschiedener Antikörper, die mit dem gleichen Antigen an verschiedenen Bindungsstellen mit verschiedener Affinität reagieren, dazu aber auch Antikörper gegen andere Antigene, die die früheren Erfahrungen des Individuums widerspiegeln. Die erfolgreiche Anwendung von Antikörpern zur Bestimmung und Reinigung von Antigenen erfordert aber hohe Spezifität und Reproduzierbarkeit.

Homogene Antikörper, die diese Anforderung erfüllen, sind durch die von Köhler und Milstein (17) beschriebene Hybridoma-Technik zugänglich geworden. Prinzipiell besteht die Technik darin, daß Antikörper ausscheidende B-Lymphozyten, z.B. aus der Milz, immunisierter Tiere mit Tumorzellen verschmelzen ("fusioniert") werden. Die gebildeten Hybridoma-Zellen kombinieren die Fähigkeit zur unbegrenzten Vermehrung durch Teilung mit der Fähigkeit, einen einheitlichen Typ Antikörper zu bilden und auszuschcheiden. Durch Kultivierung in einem selektiven Medium, in dem nicht fusionierte Tumorzellen absterben, Hybridoma-Zellen sich aber vermehren, und durch geeignete Manipulationen können Klone, d.h. Zellpopulationen, die sich von einer einzigen Hybridoma-Zelle ableiten und genetisch identisch sind, gewonnen und kultiviert und die durch die Zellen produzierten monoklonalen Antikörper isoliert werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen VAC, Hybridomazellen, die solche Antikörper produzieren und Verfahren zu ihrer Herstellung. Bevorzugt sind Hybridomazelllinien und die von diesen ausgeschiedenen monoklonalen Antikörper, die spezifisch mit VAC reagieren. Das Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Anti-VAC- $\alpha$  und Anti-VAC- $\beta$ -Antikörpern ist dadurch gekennzeichnet, daß man Mäuse mit VAC immunisiert, B-Lymphozyten derart immunisierter Tiere mit Myelomazellen fusioniert, die gebildeten Hybridomazellen kloniert, dann in vitro oder durch Injektion in Mäusen kultiviert und aus den Kulturen Antikörper isoliert.

Die Erfindung betrifft ferner Immuno-Affinitätschromatographie-Säulen und Test-Kits für Immunoassays, die diese Antikörper enthalten.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren werden Mäuse, z.B. Balb/c-Mäuse, auf an sich bekannte Weise immunisiert. In einer bevorzugten Ausführungsform wird VAC etwa wöchentlich oder auch in größeren Abständen während mehrerer Wochen, beispielsweise 5 bis 12 Wochen, injiziert, bis sich eine genügende Zahl Antikörper-produzierender B-Lymphozyten gebildet hat.

Zur Steigerung der Immunogenität des eingesetzten VAC wurde es an stark immunogene Träger wie beispielsweise heterologes Albumin oder "keyhole limpet hemocyanin" (KLH) gekoppelt. Bevorzugt wurden verschiedene VAC/KLH Präparationen eingesetzt, wobei nach einem Immunisierungsschema so lange immunisiert wurde, bis sich genügend Antikörper-produzierende Zellen gebildet hatten, beispielsweise bis zu ca. 40 Wochen. B-Lymphozyten enthaltende Organe, z. B. Milzzellen, der immunisierten Mäuse werden entnommen und mit solchen Myelomazellen fusioniert, die aufgrund einer Mutation in einem selektiven Kulturmedium nicht wachsen. Solche Myelomazellen sind bekannt und sind beispielsweise jene mit der Bezeichnung X63-Ag8, X73-Ag8.6.5.3, MPC-11, NS1-Ag4/1, MOPC-21 NS/1 oder SP 2/0. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Milzzellen immunisierter Mäuse mit Myelomazellen der Zell-Linie X63-Ag8.6.5.3 fusioniert.

Die Fusion wird nach an sich bekannten Verfahren durch Mischen der B-Lymphozyten und der Myelomazellen unter Zugabe eines Zellfusionsagens, wie Polyethylenglykol, Sendai-Virus, Calciumchlorid oder Lysolecithin durchgeführt. Vorzugsweise wird in Gegenwart von Polyethylenglykol, beispielsweise mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 4000, fusioniert.

Nach der Fusion werden die entstandenen Hybride nach einem an sich bekannten Verfahren in einem selektiven Kulturmedium, das mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium) komplementiert ist, kultiviert. Nicht fusionierte Myelomazellen können in diesem Medium nicht wachsen und sterben ebenso wie normale Lymphozyten.

Die Überstände der Hybridoma-Kulturen können mit an sich bekannten Verfahren auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern geprüft werden, beispielsweise mit Radio-Immunoassay, ELISA oder Agglutination. Dabei wird überraschenderweise festgestellt, daß mit dem beschriebenen Verfahren Hybridoma-Zellen gewonnen werden können, die Antikörper spezifisch gegen VAC ausscheiden. Die Hybridomazellen, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren, werden aus dem aus der Fusionierung hervorgegangenen Gemisch verschiedenster Hybridomazellen durch Klonieren herausselektioniert. Dazu werden nach einem an sich bekannten Verfahren, das "limiting dilution" genannt wird, Kulturen ausgehend von einer einzigen wachsenden Zelle angesetzt.

Zur Massenproduktion werden die Hybridoma-Zellklone, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren, entweder in an sich bekannten Medien in vitro kultiviert oder zur Vermehrung in Mäuse injiziert. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Hybridomazellen in mit Pristan vorbehandelte Mäuse injiziert, Aszites-Flüssigkeit entnommen und daraus durch Fällung mit Ammoniumsulfat-Lösung Antikörper isoliert.

Die mit Hilfe dieser Hybridomazellen gewonnenen VAC spezifischen Antikörper können auf an sich bekannte Weise für die Herstellung von Immuno-Affinitätschromatographie-Säulen verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein geeignetes Trägermaterial (suspendiert in einer Pufferlösung) mit einer Antikörper-Lösung versetzt, ungebundene Anteile werden anschließend ausgewaschen und unbesetzte Stellen des Trägermaterials blockiert.

Die mit Hilfe der Hybridomazellen gewonnenen VAC spezifischen Antikörper können auf an sich bekannte Weise für die Herstellung von Test-Kits verwendet werden. Diese Test-Kits können auf verschiedenen Methoden beruhen, beispielsweise auf Radio-Immuno-Assay, Latex-Agglutinierung, Tüpfel-Tests, Kompetitive oder Sandwich-Radio-Immunoassay, Enzym-Immunoassay, Immuno-Fluoreszenz oder immunochemischen Enzym-Tests. Solche Kits können neben gewöhnlichen Antikörpern verschiedener Herkunft

5 Antikörper-Konjugate mit Enzymen oder Fluoreszenzträgern enthalten, dazu VAC markiert mit radioaktiven Isotopen wie  $J^{125}$ , oder konjugiert mit Enzymen, beispielsweise mit Meerrettich-Peroxidase oder alkalischer Phosphatase, ferner Enzymsubstrate, geeignete Puffer, Gele, Latex, Polystyrol oder andere Füllmaterialien und Träger.

10 Die gemäß der vorliegenden Erfindung erhältlichen bekannten Proteine (Peptide) weisen wertvolle pharmakologische Eigenschaften auf und können prophylaktisch oder insbesondere therapeutisch angewendet werden.

Die erfindungsgemäßen neuen VAC Verbindungen können daher in Analogie zu natürlichen VAC zur Therapie und Prophylaxe von Thrombosen und Thromboembolien, einschließlich zur Prophylaxe von

15 postoperativen Thrombosen, zur akuten Schock-Therapie (z. B. bei septischem oder polytraumatischem Schock), zur Therapie von Verbrauchskoagulopathien, bei Hämodialysen, Hämostaseparationen, Blutkonserven und im extrakorporalen Kreislauf verwendet werden.

Die Erfindung betrifft ebenfalls pharmazeutische Zusammensetzungen, welche wenigstens eine der erfindungsgemäßen Verbindungen oder deren pharmazeutisch annehmbaren Salze, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger und/oder Hilfsstoffen, enthalten. Diese Zusammensetzungen können insbesondere bei den oben angegebenen Indikationen Verwendung finden, wenn sie z. B. parenteral, wie intravenös, intracutan, subcutan oder intramuskulär, oder topisch verabreicht werden.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung der erfindungsgemäßen neuen Verbindungen und diese enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen für die prophylaktische und therapeutische Behandlung

25 des menschlichen und tierischen Körpers, insbesondere bei den oben angegebenen Krankheitsbildern, in erster Linie zur Hemmung der Gerinnung des Blutes innerhalb und außerhalb des menschlichen und tierischen Körpers.

Die Dosierung hängt in erster Linie von der spezifischen Verabreichungsform und vom Zweck der Therapie bzw. Prophylaxe ab. Die Größe der Einzeldosen sowie das Verabreichungsschema kann am besten anhand einer individuellen Beurteilung des jeweiligen Krankheitsfalles bestimmt werden: die dazu erforderlichen Methoden zur Bestimmung von relevanten Blutfaktoren sind dem Fachmann geläufig. Im Normalfall liegt bei einer Injektion die therapeutisch wirksame Menge der erfindungsgemäßen Verbindungen im Dosisbereich von etwa 0,005 bis etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht. Bevorzugt wird der Bereich von etwa 0,01 bis etwa 0,05 mg/kg Körpergewicht. Die Verabreichung erfolgt durch intravenöse, intramuskuläre oder

35 subcutane Injektion. Dementsprechend enthalten pharmazeutische Präparate zur parenteralen Verabreichung in Einzeldosis-Form in Abhängigkeit von der Applikationsart pro Dosis etwa 0,4 bis etwa 7,5 mg der erfindungsgemäßen Verbindung. Neben dem Wirkstoff enthalten diese pharmazeutischen Zusammensetzungen üblicherweise noch einen Puffer, z. B. einen Phosphatpuffer der den pH-Wert zwischen etwa 3,5 und 7 halten soll, und ferner Natriumchlorid, Mannit oder Sorbit zur Einstellung der Isotonie. Sie können in gefriergetrockneter oder gelöster Form vorliegen, wobei Lösungen ein antibakteriell wirkendes Konservierungsmittel, z. B. 0,2 bis 0,3 % 4-Hydroxybenzoesäuremethylester oder - ethylester, enthalten können. Ein Präparat für die topische Anwendung kann als wässrige Lösung, Lotion oder Gelee, ölige Lösung oder Suspension, oder fetthaltige oder insbesondere Emulsions-Salbe vorliegen. Ein Präparat in Form einer wässrigen Lösung erhält man beispielsweise dadurch, daß man die erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder ein

45 therapeutisch annehmbares Salz davon in einer wässrigen Pufferlösung von pH 4 bis 6,5 löst und gewünschtenfalls einen weiteren Wirkstoff, z. B. ein Antiinflammatorikum, und/oder ein polymeres Haftmittel, z. B. Polyvinylpyrrolidon, und/oder ein Konservierungsmittel zufügt. Die Konzentration des Wirkstoffs beträgt etwa 0,1 bis etwa 1,5 mg, vorzugsweise 0,25 bis 1,0 mg, in 10 ml einer Lösung bzw. 10 g eines Geles.

Eine ölige Applikationsform für die topische Verabreichung erhält man beispielsweise durch Suspendieren der erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder eines therapeutisch annehmbaren Salzes davon in einem Öl, gegebenenfalls unter Zusatz von Quellmitteln, wie Aluminiumstearat, und/oder grenzflächenaktiven Mitteln (Tensiden), deren HLB-Wert ("hydrophilic-lipophilic-balance") unter 10 liegt, wie Fettsäuremonoester mehrwertiger Alkohole, z. B. Glycerinmonostearat, Sorbitanmonolaurat, Sorbitanmonostearat oder Sorbitanmonooleat. Eine fetthaltige Salbe erhält man z. B. durch Suspendieren der erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder

55 deren Salze in einer streichbaren Fettgrundlage, gegebenenfalls unter Zusatz eines Tensids vom HLB-Wert unter 10. Eine Emulsionssalbe erhält man durch Verreiben einer wässrigen Lösung der erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder deren Salze in einer weichen, streichbaren Fettunterlage unter Zusatz eines Tensids, dessen HLB-Wert unter 10 liegt. Alle diese topischen Applikationsformen können auch Konservierungsmittel

enthalten. Die Konzentration des Wirkstoffes beträgt 0,1 bis 1,5 mg, vorzugsweise 1,25 bis 1,0 mg, in etwa 10 g der Grundmasse.

Neben den oben beschriebenen und ihren analogen pharmazeutischen Zusammsetzungen, welche für einen direkten medizinischen Einsatz am Körper des Menschen oder eines Säugetieres bestimmt sind, betrifft die vorliegende Erfindung auch pharmazeutische Zusammensetzungen und Präparate zur medizinischen Anwendung außerhalb des lebenden Körpers des Menschen oder der Säugetiere. Solche Zusammensetzungen und Präparate verwendet man in erster Linie als gerinnungshemmenden Zusatz zu Blut, welches außerhalb des Körpers einer Zirkulation oder Behandlung (z.B. extrakorporaler Kreislauf oder Dialyse in künstlichen Nieren), Konservierung oder Modifizierung (z.B. Hämostaseparation) unterzogen wird. In ihrer Zusammensetzung sind derartige Präparate, wie Vorratslösungen oder auch Zubereitungen in Einzeldoses-Form, den oben beschriebenen Injektionspräparaten ähnlich; zweckmäßigerweise wird aber die Wirkstoffmenge bzw. -konzentration auf das Volumen des zu behandelnden Blutes bezogen. Je nach dem spezifischen Zweck beträgt die geeignete Dosis etwa 0,01 bis etwa 1,0 mg Wirkstoff/l Blut, wobei die obere Grenze ohne Gefahr noch überschritten werden darf.

Insbesondere betrifft die Erfindung die in den Belegbeispielen beschriebenen, für die für VAC-Proteine kodierenden DNA-Moleküle, solche DNA-Moleküle enthaltende Expressionsplasmide, mit solchen Expressionsplasmiden transformierte Mikroorganismen, monoklonale Antikörper gegen VAC, Hybridoma-Zellen, die solche Antikörper produzieren, und Test-Kits für Immunoassays, die solche Antikörper enthalten, die in den Beispielen beschriebenen Verfahren zu ihrer Herstellung und das in den Beispielen beschriebene Verfahren zur Herstellung von Proteinen/Polypeptiden mit VAC-Aktivität mit Hilfe der transformierten Mikroorganismen, sowie die in den Beispielen beschriebenen neuen VAC-Verbindungen.

Wird in der vorliegenden Anmeldung von vascular-antikoagulierenden Proteinen oder in der Kurzform VAC-Protein gesprochen, so bedeutet das wenn nicht anders angegeben, daß hiermit Polypeptide/ Proteine gemeint sind, die im wesentlichen die Eigenschaften aufweisen, die den Proteinen eigen sind, die in der EPA 181 465 erstmals beschrieben wurden. Diese Eigenschaften lassen sich durch die dort angegebenen Test- und Charakterisierungsverfahren feststellen und überprüfen (VAC-Aktivität).

Weiterhin fallen unter diese Definition auch die Polypeptide/Proteine, die Aggregationen wie beispielsweise Dimere, Trimere oder Tetramere darstellen, auch wenn diese in der aggregierten Form per se nicht oder nur eingeschränkte biologische Aktivitäten aufweisen, unter der Voraussetzung, daß diese in vivo oder in vitro in zumindest eine aktive Komponente zu überführen sind.

Werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Polypeptide/ Proteine erhalten, die per se nicht oder nur eingeschränkte biologische Aktivitäten aufweisen, beispielsweise Fusionsproteine oder sogenannte "pro-drugs", Polypeptide/Proteine, die für den Fachmann an in such bekannter Weise in die aktiven Komponenten überführbar sind, beispielsweise durch in vitro oder in vivo Prozessierung oder Polypeptide/Proteine, die erst in vivo ihre Aktivität entfalten, so sollen auch diese unter die Definition vascular-antikoagulierende-, kurz VAC-Proteine gefaßt sein und damit zum Gegenstand der vorliegenden Erfindung gehören.

Unter "Verbindungen mit VAC-Aktivität" werden auch solche, von den genannten transformierten Wirtszellen exprimierte Polypeptide verstanden, welche eine VAC-Wirkung und eine positive Reaktion mit anti-VAC-Antikörpern zeigen und welche die Primärstruktur von VAC oder eine davon abgeleitete Struktur aufweisen. Unter VAC-Verbindungen mit einer von der Primärstruktur von VAC abgeleiteten Struktur werden modifizierte VAC-Verbindungen verstanden, wobei die Modifizierung in einer Verkürzung der Primärstruktur des VAC, in einer Umordnung der Repeat-Struktur oder in einer Modifizierung, die zu einer Veränderung der Stabilität bzw. Aktivität führt.

VAC-DNA/Gen steht in der vorliegenden Erfindung für die DNA-Moleküle, die für die oben definierten VAC-Proteine kodieren.

Die folgenden Beispiele und Zeichnungen dienen zur Illustration der Erfindung und sollen sie in keiner Weise einschränken.

Um die nachfolgenden Beispiele zu vereinfachen, werden oft wiederkehrende Methoden kurz beschrieben.

Plasmide werden mit einem kleinen "p" bezeichnet, gefolgt von Großbuchstaben und Ziffern. Ausgangsplasmide sind käuflich oder ohne Einschränkung öffentlich erhältlich. Sie können auch aus solchen Plasmiden mittels publizierter Methoden konstruiert werden.

"Schneiden" oder "Verdauen" von DNA bezieht sich auf die katalytische Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) an für diese spezifischen Stellen, Restriktionsstellen genannt. Restriktionsendonukleasen sind käuflich erhältlich und werden unter den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen (Puffer, Rinderserumalbumin (BSA) als Trägerprotein, Dithiothreitol (DTT) als Oxidationsschutz) eingesetzt.

Restriktionsendonukleasen werden mit einem Großbuchstaben, meist gefolgt von Kleinbuchstaben und normalerweise einer römischen Ziffer bezeichnet. Die Buchstaben hängen von dem Mikroorganismus ab, aus dem die betreffende Restriktionsendonuklease isoliert wurde (z.B.: Sma I: *Serratia marcescens*). Üblicherweise wird etwa 1 µg DNA mit einer oder mehreren Einheiten des Enzyms in etwa 20 µl Pufferlösung geschnitten. Normalerweise wird eine Inkubationsdauer von 1 Stunde bei 37 °C verwendet, kann aber laut den Verwendungsvorschriften des Herstellers variiert werden. Nach dem Schneiden wird manchmal die 5'Phosphatgruppe durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm (CIP) entfernt. Dies dient zur Verhinderung einer ungewünschten Reaktion der spezifischen Stelle in einer nachfolgenden Ligasereaktion (z.B. Zirkularisierung eines linearisierten Plasmids ohne Insertierung eines zweiten DNA-Fragmentes). Wenn nicht anders angegeben werden DNA-Fragmente nach dem Schneiden mit Restriktionsendonukleasen normalerweise nicht dephosphoryliert. Reaktionsbedingungen für die Inkubation mit alkalischer Phosphatase sind z.B. dem M13 Cloning und Sequencing Handbuch (Cloning and Sequencing handbook, Fa Amersham, PI/129/83/12) zu entnehmen.

Nach der Inkubation wird Protein durch Extraktion mit Phenol und Chloroform entfernt, und die DNA aus der wäßrigen Phase durch Zusatz von Äthanol präzipitiert.

"Isolierung" eines bestimmten DNA Fragments bedeutet die Auftrennung der geschnittenen DNA auf einem z.B. 1% Agarosegel. Nach der Elektrophorese und dem Sichtbarmachen der DNA im UV-Licht durch Anfärben mit Äthidiumbromid (EtBr) wird das gewünschte Fragment anhand mitaufgetragener Molekulargewichtsmarker lokalisiert und durch weitere Elektrophorese an DE 81 Papier (Schleicher und Schuell) gebunden. Die DNA wird durch Spülen mit Niedrigsalzpuffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris pH=7,5, 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend mit einem Hochsalzpuffer (1 M NaCl, 20 mM Tris pH=7,5, 1 mM EDTA) eluiert. Die DNA wird durch Zusatz von Äthanol präzipitiert.

"Southern Analyse" ist jene Methode, durch die die Gegenwart eines bestimmten DNA-Fragments in einem DNA-Gemisch durch Hybridisierung mit einer bekannten, markierten Oligonukleotidsonde oder einem markierten DNA Fragment nachgewiesen wird. Southern Analyse bedeutet im folgenden, so nicht anders spezifiziert, die Auftrennung des DNA Gemischs auf einem 1% Agarosegel, Denaturierung und Transfer auf Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schuell, BA 85) mittels der Methode von E. Southern, J. Mol. Biol. 98 (1978), pp.503-517, und Hybridisierung wie beschrieben in R. Hauptmann et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985), pp.4739-4749.

"Transformation" bedeutet das Einbringen von DNA in einen Organismus, so daß die DNA dort replizierbar ist, entweder extra-chromosomal oder als chromosomale Integrannte. Transformation von E.coli folgt der im M13 Cloning and Sequencing Handbuch (Cloning and Sequencing Handbook, Fa Amersham, PI/129/83/12) angegebenen Methode.

"Sequenzieren" einer DNA bedeutet die Analyse der Nukleotidsequenz in einer DNA. Dazu wird die DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, und die Fragmente in entsprechend geschnittene M13 mp8, mp9, mp18 oder mp19 Doppelstrang DNA eingebracht, oder die DNA wird mittels Ultraschall, nachfolgender Reparatur der Enden und Größenselektion in Sma I geschnittene, dephosphorylierte M13 mp8 DNA (Shotgun Methode) eingebracht. Nach der Transformation von E.coli JM 101 wird Einzelstrang DNA aus rekombinanten M13 Phagen entsprechend dem M13 Cloning and Sequencing manual (Cloning and Sequencing Handbook, Fa Amersham, PI/129/83/12) isoliert und nach der Sanger'schen Dideoxymethode (F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 74 (1977), pp.5463-5467) sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgt mittels der ursprünglich von R. Staden entwickelten (R. Staden, Nucleic Acids Res. 10 (1982), pp.4731-4751) und von Ch. Pieler modifizierten (C. Pieler 1987, Dissertation, Universität Wien) Computerprogramme.

"Ligieren" bezieht sich auf den Prozeß der Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Enden von Doppelstrang-DNA Fragmenten. Üblicherweise werden zwischen 0,01 und 0,2 µg DNA-Fragmente in 10 µl mit etwa 5 units T4-DNA Ligase ("Ligase") in einer geeigneten Pufferlösung ligiert (T. Maniatis et al., Molecular cloning, 1982, p.474).

"Präparation" von DNA aus Transformanten bedeutet die Isolierung der Plasmid DNA aus Bakterien mittels der alkalischen SDS Methode modifiziert nach Birnboim und Doly (T. Maniatis et al., Molecular cloning, 1982, pp.368-369) unter Weglassen des Lysozyms. Dabei werden die Bakterien aus 1,5 bis 50 ml Kultur verwendet.

"Oligonukleotide" sind kurze Polydesoxynukleotide, die chemisch synthetisiert werden. Dazu wurde der Applied Biosystems Synthesizer Modell 381A verwendet. Die Oligonukleotide werden entsprechend dem Modell 381A User Manual (Applied Biosystems) aufgearbeitet und durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) gereinigt.

"Phosphorylieren" bedeutet die enzymatische Uebertragung des gamma-Phosphatrestes aus ATP auf eine freie 5'OH-gruppe einer Nukleinsäure, meist ein Oligonukleotid. In 10 µl Lösung werden bis zu 100

pMol des Oligonukleotids mit 10 Einheiten T 4 -Poly-nukleotidkinase in Gegenwart von 100 pMol ATP in geeigneter Pufferlösung (70 mM Tris, pH=7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT) 30 Minuten bei 37°C phosphoryliert. Die Reaktion wird meist durch 10 Minuten Erhitzen auf 100°C gestoppt.  
Einige verwendete Abkürzungen sollen kurz erklärt werden:

- 5 bp: Basenpaare  
BSA: Rinderserumalbumin  
DTT: Dithiothreitol  
EDTA: Äthylendinitrioltetraessigsäure, diNatriumsalz  
10 SDS: Natriumdodecylsulfat  
Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
Denhardt: 0,02% Ficoll, 0,02% Polyvinylpyrrolidon, 0,02% BSA  
LB: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl  
1 x SSC: 150 mM NaCl, 15 mM tri-Natriumcitrat, pH = 7  
15 TE: 10 mM Tris pH = 8,0, 1 mM EDTA

#### Verzeichnis der Abbildungen:

- 20 0.1: Tryptische Fragmente aus Placenta-VAC  
0.2: HPLC der tryptischen Peptide aus Placenta-VAC  
0.3: HPLC der tryptischen Peptide aus Nabelschnur-VAC  
0.4: Gelpermeations-HPLC von Placenta- und Nabelschnur-VAC  
0.5: Reverse-Phase-HPLC von Placenta-VAC  
25 0.6: SDS-Gelelektrophorese von Placenta-VAC  
1: Screening-Oligonukleotide EBI-386, -387 und -388  
2: Screening-Oligonukleotide EBI-118 und EBI-119  
3: Northern Blot Analyse mit VAC-alfa und VAC-beta cDNA  
4: VAC-alfa cDNA Sequenz  
30 5: Anordnung der Peptidsequenzen in der VAC-alfa cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz  
6: Vierfach wiederholte Subsequenz im VAC-alfa Protein  
7: VAC-beta cDNA Sequenz  
8: Vierfach wiederholte Subsequenz im VAC-beta Protein  
9: Aminosäurezusammensetzung von VAC-alfa und VAC-beta  
35 10: Genomische Southern Blot Analyse mit VAC-alfa und VAC-beta cDNA  
11: Aminosäurevergleich von VAC-alfa mit VAC-beta  
12: Nukleotidvergleich zwischen VAC-alfa und -beta cDNA  
13: Hydrophilizitätsplot von VAC-alfa und VAC-beta  
14: Vergleich von VAC-alfa, VAC-beta, Lipocortin I und Lipocortin II  
40 15: Sequenz des Promotor- und Terminator Teils in pRH284  
16: Konstruktion von pRH291  
17: Konstruktion von pRH212  
18: Konstruktion von pRH292  
19: SDS-Gelelektrophorese der exprimierten Proteine  
45 a) Coomassie Blau gefärbtes Proteingel  
b) Western Blot

Legende: M = Molekulargewichtsmarke

+ Phosphat = Inhibition der VAC Expression

-Phosphat = VAC Expression (pho Promotor induziert)

- 50 20: Reinigung von VAC-alfa; Coomassie Blau gefärbtes SDS-Gelelektrophorese-Gel

#### Banden:

- 1: roher Extrakt  
2: Ammoniumsulfatpellet (gelöst und dialysiert) 12: 5 µg DEAE-FF-Sephacryl Fraktionen 1-11  
3: VAC-Pool nach DEAE-FF-Sephacryl Chromatographie  
55 4: VAC-Pool nach Sephacryl-S 200 HR Chromatographie  
5: gereinigtes VAC nach Q-Sephacryl-FF-Chromatographie  
6: gereinigtes, natürliches VAC aus Human-Placenta  
7: Molekulargewichtsmarker (Pharmacia; 94kD, 67kD, 43kD, 30kD, 20kD und 14kD)



- 21: Sephacryl S-200 HR Chromatographie von vorgereinigtem r-VAC- $\alpha$
- 22: Q-Sépharose-FF-Chromatographie von vorgereinigtem r-VAC- $\alpha$
- 23: Gelpermeations-HPLC von natürlichem VAC
- 24: Gelpermeations-HPLC von rekombinantem VAC- $\alpha$
- 5 25: Reverse Phase HPLC von natürlichem VAC
- 26: Reverse Phase HPLC von rekombinantem VAC- $\alpha$
- 27: HPLC der tryptischen Fragmente aus natürlichem VAC
- 28: HPLC der tryptischen Fragmente aus rekombinantem VAC- $\alpha$
- 29: SDS-Gel von einem Vergleich zwischen natürlichem und rekombinantem VAC- $\alpha$  in An- oder
- 10 Abwesenheit von DTT
- 30: SDS-Gel von rekombinantem VAC- $\alpha$  in An- oder Abwesenheit von DTT
- 31: Western Blot Analyse von natürlichem VAC und rekombinantem VAC- $\alpha$
- 32: Isoelektrische Fokussierung von natürlichem VAC und rekombinantem VAC- $\alpha$
- 33: Modifizierter Prothrombin Zeit Test mit natürlichem und rekombinantem VAC
- 15 34: Thrombin Zeit Test mit natürlichem und rekombinantem VAC
- 35: Faktor Xa Bildung im Plasma durch natürliches und rekombinantes VAC
- 36: Bindung von VAC an Phospholipid-Doppelschichten
- 37: Konstruktion von pGN25 und pGN26.
- 38: Reinigung von rekombinantem VAC  $\beta$ ; Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gelelektrophorese-Gel.
- 20 39: Reinigung von rekombinantem VAC  $\beta$ ; in process Proben.
- 40: Gelpermeation - HPLC von rekombinantem VAC  $\beta$ .
- 41: Reverse Phase HPLC von rekombinantem VAC  $\beta$ .
- 42: Reverse Phase HPLC von rekombinantem VAC  $\beta$  nach Inkubation.
- 43: Aminosäureanalyse von rekombinantem VAC  $\beta$ .
- 25 44: N-terminale Sequenzierung von rekombinantem VAC  $\beta$ .
- 45: SDS-Gel von rekombinantem VAC  $\beta$  in An- oder Abwesenheit von DTT.
- 46: Isoelektrische Fokussierung von rekombinantem VAC  $\beta$ .
- 47: Effekt von VAC- $\alpha$  und VAC- $\beta$  auf die Prothrombinase Aktivität. Prothrombin Aktivierung wurde in Anwesenheit variierender Mengen VAC- $\alpha$  (o) oder VAC- $\beta$  ( ) wie beschrieben gemessen.
- 30 48: Effekt von VAC- $\alpha$  auf die Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität.
- Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität wurde wie beschrieben bestimmt. VAC- $\alpha$  induzierte Inhibition wurde entweder bei 13,2  $\mu$ M Phospholipid o (offene Kreise) oder bei 6,6  $\mu$ M Phospholipid gemessen (ausgefüllte Kreise).
- 49: Effekt von VAC- $\beta$  auf die Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität.
- Die Bestimmung der % Inhibition erfolgte wie beschrieben. Inhibition wurde entweder bei 13,2  $\mu$ M
- 35 Phospholipid o (offene Kreise) oder bei 6,6  $\mu$ M Phospholipid gemessen (ausgefüllte Kreise).
- 50: Auswirkung von Ca<sup>++</sup> auf die VAC- $\alpha$  induzierte Inhibition der Phospholipase Aktivität. Die Inhibition wurde bei 6,6  $\mu$ M Phospholipid und 1 mM (offener Kreis), 0,5 mM (ausgefüllter Kreis), 0,1 mM (offenes Quadrat) oder 0,05 mM Ca<sup>++</sup> (ausgefülltes Quadrat) bestimmt.
- 51: Auswirkung von Ca<sup>++</sup> auf die VAC- $\beta$  induzierte Inhibition der Phospholipase Aktivität. Die
- 40 Inhibition wurde bei 6,6  $\mu$ M Phospholipid und 1 mM (offener Kreis), 0,5 mM (ausgefüllter Kreis), 0,1 mM (offenes Quadrat) oder 0,05 mM Ca<sup>++</sup> (ausgefülltes Quadrat) bestimmt.

#### Beispiel O

Das aus Nabelschnurgefäßen und/oder Placenta isolierte und gereinigte Material wurde mit Hilfe einer Reverse-Phase HPLC nachgereinigt.

Stationäre Phase: Bakerbond WP-RP 18, 4,6x250 mm, 5 $\mu$ m Teilchen, 300 Å Poren

50 Mobile Phase A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser, pH 2,2

Mobile Phase B: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril

Gradient: 20-68% B in 24 min

Fluß: 1 ml/min

Detektion: UV, 214 nm

55

Anschließend an diese Reinigungsstufe wurden beide Materialien, jeweils die Substanz, die das Molekulargewicht 32.000 aufwies, mit Trypsin verdaut.



Reaktionsbedingungen:

30 µg VAC aus Placenta in 135 µl 0,15 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,0

+ 2% w/w Trypsin (Worthington) 6 Stunden bei 37° C

5 + 2% w/w Trypsin (Worthington), über Nacht bei 37° C

30 µg VAC aus Nabelschnur in 100 µl 1%  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,0

+ 2% w/w Trypsin (Worthington) 6 Stunden bei 37° C

10 + 2% w/w Trypsin (Worthington), über Nacht bei 37° C

Die erhaltenen Bruchstücke wurden mit Hilfe von HPLC aufgetrennt und einer Sequenzierung mit einem Gasphasensequenator Typ 470A von Applied Biosystems, Programm 02 RPTH zugeführt.

15 HPLC-Trennbedingungen:

Stationäre Phase: µBondapak C18, 3,8×300 mm, 10 µ Teilchen

Mobile Phase A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser, pH 2,2

20 Mobile Phase B: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril

Gradient: 0-55% B in 55 min

Fluß: 1 ml/min

Detektion:

UV, 214 nm (obere Spur)

25 280 nm (untere Spur)

Neben dem Tryptischen Verdau wurde das über Reverse-Phase-HPLC gereinigte Material auch noch einer BrCN-Spaltung unterzogen. Auch diese Spaltpeptide wurden sequenziert und mit den Daten der Peptide aus dem tryptischen Verdau verglichen.

30 BrCN-Spaltung:

111 µg über RP-HPLC gereinigtes VAC wurden in 111 µl 70% Ameisensäure gelöst. Diese enthielt bereits den 250-fachen molaren Überschuß an BrCN (90 µg). Die Inkubation erfolgte im Dunkeln, 17 Stunden bei Raumtemperatur. 100 µl wurden für die HPLC-Auftrennung verwendet.

HPLC-Säule: µBondapak C 18

Mobile Phase A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser

Mobile Phase B: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril

40 Gradient: 0 - 70% B in 70 min

Fluß 1 ml/min

Detektion: UV, 214 und 280 nm

Ein Vergleich der hiermit erzielten Ergebnisse sowie die Analyse mittels Gelpermeations-HPLC und SDS-Gelelektrophorese belegt die Identität von VAC aus Placenta und VAC aus Nabelschnur

50 Gelpermeations HPLC:

Stationäre Phase: Waters I-125, 7,8×600 mm, 10 µm Teilchen

Mobile Phase: 0,5M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,02 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0, 25% Propylenglykol, 0,04% Tween 20

Fluß: 0,5 ml/min

Detektion: UV, 214 nm

SDS-Gelelektrophorese

SDS-Gel: 15%

Gelstärke: 0,77 mm

5 Elektrophoresebedingungen: 20 mA/Platte, 2-3 Stunden Laufzeit

Färbung: Coomassie Blue

Proben:

:8 µg VAC aus Nabelschnur bzw.

:7 µg VAC aus Placenta

10

Beispiel 1

15

Herstellung einer humanen plazentalen cDNA-Bibliothek

20

a) Gesamt-RNA Isolierung aus Plazenta

GT: 5 M Guanidinium-Thiocyanat, 50 mM Tris pH = 7,4, 25 mM EDTA. Vor Gebrauch 8%(v/v) beta-Mercaptoäthanol zusetzen. 20 ml GT werden 5 bis 10 Minuten vor Gebrauch auf Eis gekühlt, GT soll dabei

25

GH: 6 M Guanidium-Hydrochlorid, 25 mM EDTA, 10 mM beta-Mercaptoäthanol, pH = 7,0. Eiskühlen.

30

1g tiefgefrorene und mechanisch pulverisierte Plazenta werden in 20 ml GT (0°C) 20 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit mit einem Polytron (Brinkmann) gemixt. Das Volumen des Homogenats wird bestimmt, in 0,3 vol Äthanol (-20°C) gegossen, gemischt und sofort bei 12000 rpm 5' bei -10°C (Beckman JA 21 Zentrifuge, JS13.1 Rotor) zentrifugiert. Ein eventueller Proteinfilm sowie der Überstand werden entfernt. 10 ml eiskaltes GH werden dem Pellet zugesetzt und 10 Sekunden mit dem Polytron homogenisiert. Die Suspension wird 5 Minuten bei -10°C und 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein steriles Corex Röhrchen transferiert, das Pellet verworfen. Zum Überstand werden 0,025 vol 1 M Essigsäure und 0,75 vol kalter Äthanol (-20°C) zugesetzt und gut durchmischt. Nach ca. 2 Stunden Inkubation bei -20°C wird 10 Minuten bei 6000 rpm bei -20°C (JA20 Rotor) zentrifugiert. Der Proteinfilm und der Überstand werden sorgfältig entfernt. 2 ml GH (0°C) werden zum Pellet zugegeben, das Pellet resuspendiert, und die Suspension in ein 15ml Corex Röhrchen transferiert. Mit weiteren 8ml GH wird das alte Corex Röhrchen nachgespült, die Lösung mit den 2ml vereint. Es ist wichtig, daß das gesamte Pellet suspendiert ist, eventuell ist durch mildes Sonikieren nachzubehandeln. 0,025 vol 1 M Essigsäure und 0,5 vol kalter Äthanol (-70°C) werden zugesetzt und ca. 2 Stunden bei -20°C inkubiert. Zentrifugation (6000 rpm, 20 min, JA20 Rotor), Lösen und Präzipitieren werden zweimal wiederholt, wobei die totale GH-Menge auf 5 ml halbiert wird. Nach der letzten Zentrifugation soll kein Proteinfilm mehr über der Lösung sichtbar sein, sonst ist dieser Reinigungsschritt zu wiederholen. Das Pellet wird mit 5 ml Diäthylpyrocarbonat behandeltem Wasser (0°C) 2 Minuten gevortext. Die klare Lösung wird dekantiert, zu dem eventuell zurückbleibenden Pelletresten wird nochmals Wasser gegeben und gevortext, bis die Lösung klar ist. Durch Zusatz von 0,1 vol 3 M Na-Azetat (pH=5,8), 2,5 vol Äthanol and 1 Stunde Inkubation bei -70°C wird die RNA 10 Minuten bei 6000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Lösen und präzipitieren wird einmal wiederholt. Letztendlich wird die RNA in Äthanol bei -20°C aufbewahrt.

50

b) poly-A<sup>+</sup>-RNA Isolierung

55

0,5 mg oligo dT-Zellulose (Collaborative Research, Typ 3, Bindungskapazität: 5 mg poly-A<sup>+</sup>-RNA/g) werden im Bindungspuffer suspendiert (200 mM NaCl, 0,2 % SDS, 10 mM Tris, pH=7,4, 1 mM EDTA). 1 ml dieser Suspension wird in eine Säule gepackt und nacheinander mit 10 ml Wasser, 10 ml 0,1 N NaOH, 10 ml Wasser und letztlich mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Gesamt-RNA wird aus der alkalischen Lösung durch Zentrifugieren (10 Min., 6000 rpm, JA20 Rotor) pelletiert. Ca. 10 mg RNA werden in 4,5 ml

Wasser gelöst. Nach Zusatz von 50 µl 2% SDS wird die Lösung 3 Min. auf 70 °C erhitzt und unmittelbar auf Eis gekühlt. Nach dem Zusatz von 50 µl 1M Tris (pH=7,4), 10 µl 0,5 M EDTA und 200 µl 5 M NaCl wird die Lösung sofort auf die Säule aufgetragen. Die aus der Säule tropfende Lösung wird wieder auf die Säule aufgetragen. Diese Prozedur wird insgesamt dreimal wiederholt. Anschließend wird die Säule mit 30 ml Bindungspuffer gewaschen. Die gebundene RNA wird mit 5 ml 0,2% SDS eluiert. Die Säule wird mit 10 ml Wasser, 10 ml 0,1 N NaOH und 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 10 ml Bindungspuffer äquilibriert. Die RNA Lösung wird nochmals 3 Minuten auf 70 °C erhitzt, rasch auf Eis abgekühlt, 50 µl 1 M Tris pH=7,4, 10 µl 0,5 M EDTA und 200 µl 5 M NaCl zugesetzt und auf die Säule aufgetragen. Die durchlaufende Lösung wird insgesamt dreimal auf die oligo-dT Säule aufgetragen. Nach dem Waschen wird die RNA mit 30 ml 0,32% SDS eluiert.

Durch Zugabe von 0,1 vol 3M Na-Azetat pH=5,6 und 2,5 vol Aethanol sowie Inkubation bei -20 °C (16 Stunden) wird die RNA ausgefällt. Die RNA wird abzentrifugiert (10 000 rpm, 15 Min., JA-20 Rotor) und in Wasser mit einer Konzentration von 1 µg/µl gelöst.

### c) Konstruktion der Lambda-gt10 cDNA Bibliothek

Die Synthese der cDNA, das Methylieren der internen EcoRI-Stellen, das Anbringen von EcoRI Linkern, das Nachschneiden mit EcoRI, die Abtrennung der kurzen DNA-Fragmente, das Ligieren mit den Lambda-gt10 Armen und das in vitro Verpacken der ligierten DNA erfolgte mit dem cDNA Synthese System von Amersham (RPN 1256) sowie dem cDNA Kloniersystem Lambda-gt10 (Amersham, RPN 1257). Die beigefügten Arbeitsvorschriften wurden genau eingehalten. Ausgehend von etwa 3 µg wurden mRNA letztendlich ca.  $0,5 \times 10^6$  rekombinante Lambda-gt10 Phagen erhalten.

### Beispiel 2

### cDNA Isolierung

#### a) Durchsuchen der Lambda-gt10 Bibliothek mit Oligonukleotiden

Zum Durchsuchen der cDNA-Bibliothek nach für VAC-protein kodierender cDNA wurden entsprechend der Sequenzen des tryptischen Peptides P16/II zwei und des Staph A Peptides P20/II/6 ein Oligonukleotid synthetisiert (Fig.1). Diese Oligonukleotide stellen jeweils eine Mischung aller Varianten dar, die jede Kodierungsmöglichkeit der entsprechenden mRNA berücksichtigen. EBI-386 weist bei einer Kettenlänge von 20 Nukleotiden 512 Variationen auf und paßt zu dem Staph-A Peptid P20/II/6. Um die Variation bei dem Oligonukleotid für das tryptische Peptid P16/II niedriger zu halten, wurden zwei Oligonukleotide (20-mere) synthetisiert: EBI-387: 128 Variationen, EBI-388: 64 Variationen.

Weiters wurden zu dem tryptischen VAC-Peptid P30/I passend zwei Oligonukleotide unter Verwendung von Desoxyinosin als Base bei "Wobble" Positionen synthetisiert (Fig.2): EBI-118 und EBI-119. Diese Substitution wurde von E. Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260/5 (1985), pp.2605-2608, sowie Y. Takahashi et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (1985) pp.1931-1935, beschrieben. Inosin basenpaart gut mit Cytosin, stört jedoch kaum die Ausbildung der Doppelhelix, wenn andere Nukleotide als Partner angeboten werden.

Jeweils 60 pMol jedes Oligonukleotids wurden mit 60 pMol gamma-<sup>32</sup>P-ATP (Amersham, PB 218, 5000 Ci/mMol) in 30 µl Lösung unter Verwendung von 20 Einheiten T<sub>4</sub> Polynukleotidkinase phosphoryliert. Die Lösung enthielt 70 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM DTT, die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Durch Zugabe von 30 mM EDTA und 5 Minuten Erhitzen auf 70 °C wurde die Reaktion gestoppt. Das markierte Oligonukleotid wurde durch Säulenchromatographie über Biogel P6DG (Biorad) von nicht eingebauter Radioaktivität getrennt. Pro Oligonukleotid wurden zwischen 70 und  $110 \times 10^5$  cpm Phosphor-32 eingebaut.

Je 15 pMol EBI-118 und EBI-119 wurden in 90 µl unter Einsatz von 45 pMol gamma-<sup>32</sup>P-ATP (Amersham, PB 218, >5000 Ci/mMol) mit 10 Einheiten T<sub>4</sub>-Polynukleotidkinase Phosphoryliert und anschließend über Biogel P6DG gereinigt. Insgesamt wurden  $70 \times 10^5$  cpm Phosphor-32 eingebaut.

Ungefähr  $1,2 \times 10^6$  pfu (Plaques forming units) rekombinante Phagen einer humanen, plazentalen cDNA

Bibliothek im Phagen Lambda-gt10 wurden verwendet, um E.coli C600 zu infizieren. Etwa 50.000 Phagen wurden pro 13,5 cm Petrischale plattiert (LB, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 15 g/l Bacto-Agar). Nachdem die Plaques fast konfluent waren, wurden von jeder Platte 2 Abzüge auf Nitrozellulosefilter hergestellt (Schleicher und Schuell, BA85) (T. Maniatis et al., Molecular Cloning, 1982, pp 320 321).

- 5 Die Filter wurden 3x20 Minuten in TE bei 100 °C behandelt und anschließend über Nacht bei 65 °C gewaschen:

10 Waschlösung:

50 mM Tris pH = 8

1 M NaCl

1 mM EDTA

- 15 0,1 % SDS

Danach wurden die Filter 4 Stunden bei 49 °C prähybridisiert:

20

Prähybridisierlösung:

6 x SSC

- 25 5 x Denhardt

0,1 % SDS

1 mM Na-Pyrophosphat

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH = 6,5

100 µM ATP

- 30 80 µg/ml denaturierte Hering Sperm DNA

Die Hybridisierung erfolgte in der gleichen Lösung unter Einsatz der gesamten Menge markierter Oligonukleotide. Die doppelten Abzüge der Platten 1 bis 6 wurden mit EBI-386, jene der Platten 7-12 mit EBI-387 und EBI-388 16 Stunden bei 49 °C hybridisiert. Die Abzüge der Platten 13-24 wurden 16 Stunden mit EBI-118 und EBI-119 bei 37 °C hybridisiert. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Filter zweimal mit 6x SSC/0,01% SDS gespült, 2 x 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 6x SSC / 0,01% SDS und 3 x 20 Minuten in der gleichen Lösung bei 49 °C bzw. 37 °C gewaschen. Nach dem Lufttrocknen wurden die Filter an Kodak X-Omat S Film bei -70 °C unter Verwendung einer Verstärkerfolie exponiert.

Lambda-Phagen, die auf beiden Filtern Hybridisierung mit dem Oligonukleotid zeigten, wurden unter Verwendung desselben Hybridisierungsprotokolls zur Homogenität gereinigt.

Aus der Hybridisierung mit EBI-386, -387 und -388 resultierten die Phagen Lambda-P11/3, Lambda-P6/5, Lambda-P6/6. Die Hybridisierung mit EBI-118 und -119 resultierte in den Phagen Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22.

45

b) Isolierung der cDNA Inserts

E.coli C 600 wurde mit  $2,5 \times 10^6$  pfu (Plaque forming units) Phagen infiziert und mit 6 ml Topagarose (0,7 % Agarose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, LB) auf 13,5 cm Agarplatten (LB, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,5% Agarose, 0,2% Glukose) plattiert. Nach 5 1/2 Stunden Inkubation bei 37 °C waren die Plaques konfluent. Die Platten wurden 30 Minuten bei 4 °C gekühlt und die Agarose mit 10 ml Lambda-Diluent (10 mM Tris, pH=8, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM EDTA) überschichtet. Die Phagen wurden über Nacht bei 4 °C unter leichten Schütteln eluiert. Die überstehende Phagensuspension (ca. 8 ml) wurde in Corexröhrchen transferiert und 10 Minuten bei 15.000 rpm (4 °C, JA 21 Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde in Polycarbonatröhrchen dekantiert und bei 50.000 rpm (20 °C, L709 Beckman-Zentrifuge, 20 °C, 50 Ti Rotor) bis  $\omega t = 3 \times 10^{10}$  (ca 23 Minuten) zentrifugiert. Die pelletierten Phagen wurden nach Entfernen des Überstandes in 0,5 ml Lambda-Diluent resuspendiert und in Eppendorf Röhrchen transferiert. Die Suspension wurde durch kurzes Zentrifugieren von nichtsuspendierten Teilchen befreit, der Überstand in ein neues Röhrchen gefüllt. Nach

Zusatz von 10 Mg/ml RNaseA und 1 µg/ml DNase I wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 25 mM EDTA, 25 mM Tris, pH=8, 0,2% SDS wurde 30 Minuten bei 70°C inkubiert. Als nächstes wurde 1 vol Phenol/chloroform (1:1) zugegeben, und Proteine durch Kippen des Röhrchens extrahiert. Nach 2 Minuten Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge wurde die wäßrige Phase mit 1 vol Chloroform extrahiert (nur Kippen, nicht Vortexen). Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wurden dem Ueberstand 1/20 vol 3 M Na-Azetat und 1 ml Äthanol zugesetzt. Dabei fiel die Phagen DNA fadenförmig aus. Nach 5 Minuten Inkubation bei 0°C wurde die DNA abzentrifugiert (10 Minuten). Das Pellet wurde einmal mit 70 % Äthanol gewaschen, getrocknet und über Nacht in 50 µl TE gelöst (4°C).

Die DNAs wurden mit EcoRI geschnitten und die entstehenden Fragmente auf einem 1% Agarosegel getrennt. Die cDNA Inserts der Klone Lambda-P11/3, Lambda-P6/5 und Lambda-P6/6 hatten Größen von etwa 1300 bis 1400 bp. Die Sequenzanalyse zeigte, daß alle drei Klone von ein und derselben mRNA abgeleitet waren. Das 5'Ende der mRNA fehlte jedoch in den cDNAs. Die Inserts der Phagen Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22 hatten Längen von ca. 1600, 1100 und 1000 bp. Die Sequenzanalyse ließ eine annähernd vollständige cDNA vermuten. Die cDNAs der beiden Phagengruppen Lambda-P11/3, Lambda-P6/5 und Lambda-P6/6 sowie Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22 sind von zwei verschiedenen mRNAs abgeleitet wie die nachfolgende Sequenzanalyse ergab.

Die EcoRI Inserts der drei Klone Lambda-P11/3, Lambda-P6/5 und Lambda-P6/6 wurden isoliert und in dem EcoRI-geschnittenen Bluescribe M13<sup>+</sup> Vektor ligiert (Vector Cloning Systems, 3770 Tanst Street, San Diego, CA 92121, USA). Die resultierenden Klone wurden pP6/5, pP6/6 und pP11/3 genannt.

Die EcoRI Inserts der drei Klone Lambda-Nr15, Lambda-Nr19 und Lambda-Nr22 wurden isoliert und in den EcoRI-geschnittenen Bluescribe M13<sup>+</sup> Vektor ligiert. Die resultierenden Klone wurden pRH201, pRH202 und pRH203 genannt.

#### c) Weitere VAC cDNA Klone

Um weitere cDNA Klone zu erhalten, wurde die humane, plazentale Lambda-gt10 Bibliothek nochmals durchsucht, diesmal mit dem EcoRI-Insert des pP11/3 als Sonde.

Dieses DNA-Fragment wurde durch Nicktranslation radioaktiv markiert (T.Manias, Molecular Cloning, 1982, pp.109-112, keine DNase I verwendet). Insgesamt wurden  $4 \times 10^5$  Phagen auf 8 Platten durchsucht. Die Behandlung der Nitrozellulosefilter erfolgte wie in T.Manias, Molecular Cloning, 1982, pp.320-321 beschrieben. Die Hybridisierungslösung enthielt  $6 \times \text{SSC}$ ,  $5 \times$  Denhardt's, 0,1% SDS sowie  $20 \times 10^6$  cpm pP11/3 Insert. Die Hybridisierungsdauer betrug 16 h bei 65°C. Die Filter wurden danach  $3 \times 10$  Minuten bei Raumtemperatur mit  $6 \times \text{SSC}/0,01\%$  SDS und  $3 \times 45$  Minuten bei 65°C und mit  $0,2 \times \text{SSC}$  gewaschen. Insgesamt wurden 69 positiv reagierende Klone erhalten (Lambda-VAC1 bis Lambda-VAC69).

12 dieser Klone wurden im kleinen Maßstab wie oben beschrieben präpariert, die cDNA Inserts mit EcoRI freigesetzt und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Dabei zeigte sich, daß das Insert des Klons Lambda-VAC10 den gesamten für VAC Protein kodierenden Leserahmen enthält.

#### Beispiel 3

#### Charakterisierung der cDNAs kodierend für VAC-alfa und VAC-beta

##### a) Northern Blot Experiment

Zu 2 µg poly-A<sup>+</sup> RNA wurden 5 µl Wasser, 16 µl Formamid, 6 µl Formaldehyd und 3 µl 0,1 M NaOH zugesetzt, die Lösung 10 Minuten bei 68°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zusatz von 5 µl Farbstofflösung (je 0,4% Bromphenolblau und Xylencyanol in 50% Glycerin, 1 mM EDTA) wurde die RNA auf einem Formamid-Agarosegel aufgetrennt (1,5% Agarose, 10 mM Na-Phosphat pH=7,6, 1 mM EDTA, 5 mM Na-Azetat, 6% Formaldehyd, Elektrophorese 100 V, 3 Stunden, Laufpuffer wie Gelpuffer, ohne Formaldehyd). Als Referenz wurde Gesamt-RNA aufgetragen. Diese Spur wurde nach der Elektrophorese abgetrennt und mit EtBr angefärbt, um die Lage der 28 und 18 S rRNA zu bestimmen. Der Rest des Gels wurde zweimal 10 Minuten in  $10 \times \text{SSC}$  gewaschen, und die RNA mit  $20 \times \text{SSC}$  auf Nitro-zellulosefilter

übertragen. Das Filter wurde mit 2×SSC gewaschen, getrocknet und 2 Stunden im Vakuum bei 80 °C gebacken. Jeweils 1 µg pP11/3 und pRH203 wurden mit dem Multiprime DNA labelling System (Amersham, RPN 1601) radioaktiv markiert. Das Nitro-zellulosefilter wurde 2 h bei 65 °C in 6×SSC/5× Denhardt's/0,1% SDS prähybridisiert. Jeweils eine Spur wurde mit 180×10<sup>6</sup> cpm pP11/3 bzw. pRH203 hybridisiert (16h 65 °C). Die Filter wurden zweimal 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 6×SSC/0,01% SDS und zweimal 30 Minuten bei 65 °C mit 0,2×SSC/0,01% SDS gewaschen, getrocknet und an Kodak X-Omat S Film mit Verstärkerfolie exponiert.

Das Ergebnis ist in Fig.3 abgebildet. Die cDNA des Klon pP11/3 hybridisiert an eine mRNA der Größe von etwa 1700 Basen ("VAC-alpha"), die cDNA des Klon pRH 203 an eine mRNA der Größe von etwa 2200 Basen ("VAC-beta").

Da erstens die eingesetzte Radioaktivitätsmenge sowie die aufgetragene Menge mRNA pro Spur etwa gleich war und zweitens die Hybridisierung eines Genom-Blots in derselben Lösung Banden gleicher Intensität mit beiden cDNAs ergab (siehe unten), ist zu schließen, daß die kürzere mRNA ("VAC-alfa") in größeren Mengen als die längere ("VAC-beta") mRNA in Plazenta vertreten ist.

#### b) Sequenzanalyse der VAC-alfa cDNA

Die cDNA Klone pP6/5, pP6/6 und pP11/3 wurden total, sowie die der Klon Lambda-VAC1 bis -12 partiell sequenziert. Das Resultat ist in Fig.4 abgebildet. Es wurden insgesamt 1465 Basen sequenziert. Die cDNA weist einen langen, offenen Leserahmen auf, der für 320 Aminosäuren kodieren kann. Wird die DNA Sequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt, so können alle sequenzierten Peptide in dieser Sequenz untergebracht werden (Fig.5). Es handelt sich daher bei dieser cDNA um jene, deren korrespondierende mRNA für VAC-protein kodiert. Da die Sequenzen der zweiten isolierten cDNA (siehe unten) für ein ähnliches, aber von VAC verschiedenes Protein kodiert, wird hier der Name VAC-alfa eingeführt.

Dem ersten ATG-Codon (Basen 35-37) geht im selben Leserahmen ein Stop-Codon voran. Die Basen 30 bis 38 erfüllen ziemlich gut die Kozakregel (M. Kozak, Nature 308 (1984), pp. 241-246), die die Konsensussequenz in der Nähe des Translationsstartcodons mit CC(A/G)CCAUGG angibt, die entsprechende Sequenz hier lautet TCGCTATGG. Die 3' nichttranslatierte Region ist 471 Basen lang. 15 Basen vor Beginn des poly-A Abschnitts befindet sich die Polyadenylierungssequenz AATAAA (N.J.Proudfoot et al., Nature 263 (1976), pp. 211-214). Wird eine Kettenlänge von 150 bis 200 Basen für den Poly-A Abschnitt der mRNA gerechnet, beträgt die Gesamtlänge der mRNA auf Grund der cDNA Sequenz 1600-1650 Basen. Da im Northern Blot Experiment ein höherer Wert bestimmt wurde, ist die 5'nichttranslatierte Region in keiner cDNA komplett enthalten.

Die cDNA des Klon pP6/5 weist im Gegensatz zu allen anderen cDNA Klonen an Position 100 C statt A auf. Dadurch würde sich das Triplet 98-100 (22. Codon) von GAA nach GAC ändern und für Asp anstelle von Glu kodieren. Diese Abweichung kann mehrere Ursachen haben: a) die Reverse Transkriptase baute ein falsches Nukleotid ein, b) es handelt sich um die Transkripte zweier alleler, an dieser Stelle verschiedener Gene oder c) es gibt zwei nicht allele Gene, die sich an dieser Position unterscheiden.

Der lange, offene Leserahmen kodiert für ein Protein mit 320 Aminosäuren, von dem das Met-1 wahrscheinlich abgespalten, und das folgende Alanin an der Aminogruppe, möglicherweise durch Acylierung, blockiert wird. Das errechnete Molekulargewicht beträgt 35,896 D und ist höher als der Wert nach SDS-PAGE. Allerdings ist der Anteil geladener Aminosäuren (Asp, Glu, Lys, Arg, His) mit 30,6 % (98/320) überdurchschnittlich hoch verglichen mit dem durchschnittlichen Wert von 25,1 %. Dies würde das veränderte Wanderungsverhalten des Proteins bei der SDS-PAGE erklären. Innerhalb der stark geladenen Aminosäuren überwiegen die sauren Aminosäuren (Asp und Glu) mit 54 gegenüber den basischen (Lys und Arg) mit 41. Dies erklärt den sauren, isoelektrischen Punkt des VAC-alfa Proteins (pI = 4,4 bis 4,8) VAC-alfa enthält nur ein für Cystein codierendes Triplet (Aminosäure-Position 316); eine typische N-Glykosylierungsstelle (Asn-XXX-Ser/Thr) ist nicht vorhanden. Eine Strukturanalyse der Aminosäuresequenz (modifiziert nach Pustell, J et al., Nucleic Acids Res. 10 (1982) pp 4765-4782) ergibt eine vierfache Wiederholung einer 67 Aminosäure langen Sequenz (Fig.6), im folgenden "Repeats" genannt. Innerhalb dieser Sequenz sind 7 Aminosäuren (10,4 %) in allen vier Repeats konserviert, 15 Aminosäuren (22,4 %) kommen in drei von vier Repeats vor, an 28 Positionen (41,8 %) enthalten jeweils zwei Repeats dieselbe Aminosäure.

Ein Vergleich mit publizierten Literaturdaten (M.J.Geisow, FEBS Letters 203 (1986), pp. 99-103, M.J.Geisow et al., TIBS 11 (1986), pp. 420-423) ergab überraschenderweise, daß VAC-alfa damit zu einer größeren Gruppe Ca<sup>++</sup> abhängiger Phospholipidbindungsproteine gehört. Es wird eine Konsensussequenz beschrieben

(Lys-Gly-fob-Gly-Thr-Asp-Glu-var-var-Leu-Ile-fil-Ile-Leu-Ala-fob-Arg; fob = hydrophob, fil = hydro-phil,

var=variabel), die an der  $\text{Ca}^{++}$  Bindung beteiligt sein könnte (M.J.Geisow et al., Nature 320 (1986), pp. 636-638). Diese Sequenz findet sich in jeder der vier wiederholten 67 Aminosäure langen Subsequenzen der erfindungsgemäßen Proteine (Fig.6). Auffällig ist auch der 6 Aminosäuren lange Abschnitt am Ende jeder Repeat, der fast ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren besteht ("oooooo" in Fig.6).

#### c) Sequenzanalyse der VAC-beta cDNA

Die VAC-beta cDNA Sequenz der Klone Nr15, Nr19 und Nr22 ergab 1940 bp und geht in einen poly-A Abschnitt über (Fig.7). 16 Basen vor dem poly-A Abschnitt findet sich das Polyadenylierungssignal AATAAA. Allerdings kommt diese Konsensussequenz bereits an der Nukleotidposition 1704-1709 vor. Weshalb diese Sequenz nicht als Polyadenylierungssignal verwendet wird, ist unbekannt. Die zusätzlich erforderliche Sequenz an der 3'Seite der AATAAA Sequenz, YGTGTTY (Gill A. et al., Nature 312 (1984), pp. 473-474) kommt erst relativ weit entfernt vor (TGTGTTAT, Position 1735-1742); möglich, daß dies die Erklärung für ein Nichtakzeptieren dieser ersten Polyadenylierungssequenz darstellt.

Die cDNA enthält einen langen, offenen Leserahmen, der vom Beginn der cDNA bis Position 1087 reicht. Er würde ein Kodierungspotential für 362 Aminosäuren beinhalten. Aus Analogiegründen zu VAC-alfa und aufgrund der Tatsache, daß auch ein 34.000 D Protein bei der Reinigung von VAC anfällt (siehe E.P.A. 181.465) wurde das erste Methioninkodon (ATG, Position 107-109) als Translationsstart angenommen. Die Kozakregel ist hier nicht so gut erfüllt wie bei VAC-alfa (AAGAGATGG auf Position 102-110).

Das resultierende Protein (VAC-beta) wäre 327 Aminosäuren lang. Es besitzt 4 Cysteinreste (Aminosäureposition 161, 206, 250 und 293) und eine potentielle N-Glykoxylierungsstelle (Asn-Lys-Ser, Aminosäureposition 225-227). Das errechnete Molekulargewicht beträgt 36.837 (Fig.9). Auch in VAC-beta gibt es überdurchschnittlich viele geladene Reste: 97/237 (29,6%), wobei die sauren Aminosäuren (Asp + Glu: 49) über die basischen (Lys + arg 42) überwiegen; eine Erklärung für das nach SDS-PAGE ermittelte niedrigere Molekulargewicht.

Auch VAC-beta zeigt eine interne Wiederholung einer 67 Aminosäuren langen Sequenz (Fig.8). Innerhalb dieser Sequenz sind 7 Aminosäuren (10,4 %) in allen vier Repeats konserviert, 17 Aminosäuren (25,4 %) kommen in drei von vier Repeats vor, an 25 Positionen (37,7 %) enthalten jeweils zwei Repeats dieselbe Aminosäure. Auch VAC-beta zeigt gute Übereinstimmung mit der 17 Aminosäuren langen Konsensussequenz. Die Ausführungen zum VAC-alfa gelten analog für VAC-beta.

#### d) Genomische Southernblot Analyse

Die Analyse chromosomaler DNA aus humaner Plazenta nach Southern zeigt ein komplexes Bild. Die DNA wurde mit EcoRI, HindIII, BamHI und PstI geschnitten. Die auf Nitrozellulose transferierte DNA wurde sowohl mit einer VAC-alfa DNA (pP11/3) als auch mit einer VAC-beta DNA (pRH203) hybridisiert. Das Waschen der Filter geschah unter stringenten Bedingungen (siehe Punkt a)), d.h. mit  $0,2 \times \text{SSC}$  und  $65^\circ \text{C}$ . Trotzdem ergaben sich bei jedem Verdau relativ viele Banden (Fig.10). Der Vergleich der beiden Blots zeigt, daß die Kreuzreaktion von VAC-alfa und -beta DNA unter diesen Bedingungen eher auszuschließen ist. Die Vielzahl der Banden ist entweder durch die Existenz jeweils ähnlicher Gene zu dem VAC-alfa bzw. VAC-beta Gen zu erklären, oder aber es handelt sich um jeweils ein Gen, das durch viele und/oder lange Introns unterbrochen ist.

#### Beispiel 4

#### Protein-Analyse

In Fig.11 ist der Vergleich der Aminosäuresequenzen von VAC-alfa mit VAC-beta wiedergegeben. Die wiederholten Strukturen lassen sich in beiden Proteinen gleich anordnen. Die Verbindungspeptide sind ebenfalls gleich lang mit Ausnahme jener zwischen der 2. und 3. Repeat. In dieses Verbindungspeptid muß bei VAC-alfa eine Lücke eingeführt werden, um eine optimale Anpassung der beiden Sequenzen zu erlauben. Das N-terminale Peptid der beiden Proteine ist unterschiedlich lang, 19 Aminosäuren bei VAC-alfa, 25 Aminosäuren bei VAC-beta. Dieses Peptid weist auch die geringste Homologie auf. Die beiden



Proteine sind an 176 von 320 Aminosäurepositionen ident, was einem Homologiegrad von 55,0% entspricht.

An dieser Stelle sei auch der Vergleich der Nukleotidsequenzen der VAC-alfa und -beta cDNAs eingefügt. Werden zwei Gene und deren Produkte miteinander verglichen, sieht man auf der DNA (=RNA) Ebene eine größere Homologie als auf der Aminosäureebene, was durch die Tatsache erklärt ist, daß bei der Nukleinsäure bereits eine Veränderung in einem Basentriplett ausreicht, um eine neue Aminosäure zu kodieren.

In Fig.12 ist der Vergleich der kodierenden Regionen von VAC-alfa und VAC-beta cDNA wiedergegeben. Überraschenderweise zeigen die DNAs nur einen Homologiegrad von 54,2%, also etwas weniger als die beiden Proteine.

In Fig.13 sind die Hydrophilizitätsprofile der beiden Proteine abgebildet. Dabei wurde der Algorithmus von Hopp und Wood verwendet (T.P.Hopp et al., Proc.Natl.Acad.Sci. 78 (1981) pp.3824-3828). Die vier Repeatbereiche sind durch die Balken angedeutet, die Verbindungspeptide in der darunter angegebenen Sequenz eingerahmt. Dabei fällt auf, daß das Verbindungspeptid zwischen der zweiten und dritten Repeat besonders hydrophil ist. In diesem Peptid befindet sich sowohl bei VAC-alfa als auch bei VAC-beta ein Arginin an identer Position. Es wäre daher möglich, daß dieses Arginin einen bevorzugten Angriffspunkt für eine Protease mit trypsinartiger Spezifität darstellt. Dabei müßte das Molekül in zwei etwa gleich große Hälften zerfallen. Es wäre denkbar, daß bereits ein solches "Halbmolekül" eine biologische, beispielsweise eine antikoagulierende Wirkung entfalten kann. Auf der anderen Seite könnte vielleicht der Austausch dieses Arginins durch z.B. Histidin den VAC-proteinen eine größere Stabilität vermitteln.

Aus Fig. 13 ist weiterhin leicht zu erkennen, daß weder VAC-alfa noch VAC-beta einen längeren, hydrophoben Bereich aufweisen, der entweder die Sekretion durch, oder das Einlagern der Proteine in eine Membran erlauben würden. Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei VAC-alfa und VAC-beta um intrazelluläre Proteine handelt.

Wallner et al (Nature 320 (1986), pp.77-81) berichten die Struktur des humanen Lipocortin I, Saris et al. (Cell 46 (1986), pp.201-212) und Huang et al. (Cell 46 (1986), pp. 191-199) die Struktur des murinen bzw. humanen Calpactin I, das auch Lipocortin II genannt wird. Diese Proteine gehören ebenfalls zu der Klasse der  $Ca^{++}$  abhängigen Phospholipidbindungsproteinen. Ihre Struktur läßt sich analog zu VAC-alfa und -beta anschreiben (Fig.14). Die Homologien zwischen VAC-alfa und VAC-beta sind jedoch ausgeprägter als jene zwischen VAC und Lipocortin:

VAC-alfa - VAC-beta : 55,0%  
 VAC-alfa - Lipocortin I : 41,9%  
 VAC-alfa - Lipocortin II : 43,8%  
 VAC-beta - Lipocortin I : 41,7%  
 VAC-beta - Lipocortin II : 44,6%

Anzunehmen ist daher, daß auch die Lipocortine aufgrund ihrer analogen Struktur antikoagulierende Wirkung haben, und demzufolge als Antikoagulanzen einzusetzen sind und weiterhin, daß dies eine generelle Eigenschaft dieser Klasse von  $Ca^{++}$  abhängiger Phospholipidbindungsproteine ist.

Viele Mitglieder der  $Ca^{++}$  abhängigen Phospholipidbindungsproteine binden an gereinigte sekretorische Vesikel oder andere Bestandteile des Cytoskeletts (siehe R.H.Kretsinger et al., Nature 320 (1986), p.573 für eine Zusammenfassung). Bei der Sekretion kapseln sich die Vesikel vom Golgi-Apparat der Zelle ab, wandern zur Zellmembran und fusionieren mit ihr. Dabei wird der Inhalt der Vesikel von der Zelle freigesetzt. In Analogie zur Kupplung von Erregung mit der Muskelkontraktion wurde vorgeschlagen (W.W.Douglas, Br.J.Pharmac. 34 (1968), 451), daß auch der Stimulus und die Sekretion über  $Ca^{++}$  gekoppelt ist. Dabei könnten die  $Ca^{++}$  abhängigen Phospholipidbindungsproteine eine wichtige Rolle spielen. In der konservierten, 17 Aminosäuren langen Region jeder Repeat besitzt VAC-alfa 5 bis 6 Hydroxylgruppen-enhaltende Aminosäuren (Asp, Glu, Thr, Ser), jeweils drei davon an identischer Position. Bei VAC-beta finden sich in jeder Repeat vier dieser Aminosäuren. Obwohl keines der Proteine die in Calmodulin, Troponin C, S-100 und Parvalbumin beobachtet EF-Hand Struktur aufweist (R.H.Kretsinger et al., CRC Crit. Rev.Biochem. 8 (1980), p119), die in diesen Molekülen für die  $Ca^{++}$  Bindung verantwortlich ist, verleitet die Konservierung dieses Unterabschnitts in jeder Repeat zu dem Schluß, daß diese Region für die  $Ca^{++}$  Bindung verantwortlich ist.

Durch gezielte Mutationen in diesem Bereich könnte versucht werden, die biologische Aktivität von VAC-Proteinen zu verändern.

#### Beispiel 5

## Expression von VAC-alfa in E.coli

5 a) pRH284T: Expressionsvektor mit dem alkalischen Phosphatasepromotor und Terminator

Das Gen für die alkalische Phosphatase (PhoA) aus E.coli unterliegt einer strengen Regulation. In Gegenwart von Phosphat wird das Gen komplett abgeschaltet, bei Abwesenheit von Phosphat im Medium erfolgt Genexpression. H.Shuttleworth et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986), p.8689 sowie C.N.Chang et al.,

10 Gene 44 (1986), pp.121-125 beschreiben die Nukleotidsequenz dieses Gens.

Aus mehreren Oligonukleotiden wurde die Promotorregion des PhoA gens zusammengesetzt und in EcoRI-ClaI geschnittenes pAT153 eingesetzt. Vor der ribosomalen Bindungsstelle wurde eine XhoI Stelle eingeführt. Die originale EcoRI Stelle wird beim Einligieren des synthetischen DNA-Fragmentes zerstört. Nach der ribosomalen Bindungsstelle wurde ein Translationsstart-ATG vorgesehen, dessen G das erste

15 Nukleotid einer SacI (=SstI) Stelle ist. Der Expressionsvektor läßt sich durch Schnitt mit SacI an dieser Stelle linearisieren und der 3'Überhang durch Behandlung mit DNA-Polymerase I - Klenow Fragment in Gegenwart von dGTP in ein gerades Ende überführen. Dadurch kann jedes beliebige Gen an dieser Stelle eingefügt werden, für korrekte Expression muß es mit der ersten Base der kodierenden Region beginnen.

Das HindIII-SalI Fragment des pAT-Anteils wurde entfernt und durch den alkalischen Phosphatase-  
20 Transkriptionsterminator ersetzt. Die originale SalI Stelle wurde zerstört. Dafür wurde sie vor dem Terminator zusammen mit der ebenfalls aus pAT153 deletierten BamHI Stelle wieder eingebracht. Die Sequenz der synthetisch hergestellten DNA ist in Fig.15 abgebildet.

25 b) Expressionsklon pRH291

Der cDNA Klon pP6/5 wurde mit BglII und PstI geschnitten und das 980 bp lange Fragment isoliert, das den Hauptteil der kodierenden und ca. 200 bp 3'nichttranslatierte Region enthält. Mittels Oligonukleotiden wurde das fehlende 5'Ende der kodierenden Region ersetzt. Dabei wurde durch zwei Mutationen (GGC →

30 GGT, Gly-7 und ACT → ACC, Thr-8) gleichzeitig eine KpnI-Schnittstelle in die VAC-cDNA eingeführt. Die Oligonukleotide hatten folgendes Aussehen:

```

35      | EBI-678                                     || EBI-677
5'    GCACAGGTTCTCAGAGGTACCGTGACTGACTTCCCTGGATTTGATGAGCGGGCT 3'
      CGTGTCCAAGAGTCTCCATGGCACTGACTGAAGGGACCTAAACTACTCGCCCGA
40      |                                     EBI-680 ||

      GATGCAGAACTCTTCGGAAGGCTATGAAAGGCTTGGGCACAGATGAGGAGAGC
      CTACGTCTTTGAGAAGCCTTCCGATACTTTCCGAACCCGTGTCTACTCCTCTCG
45                                     EBI-

      || EBI-682                                     |
50    ATCCTGACTCTGTTGACATCCCGAAGTAATGCTCAGEGCCAGGAAATCTCTGCA 3'
      TAGGACTGAGACAACTGTAGGGCTTCATTACGAGTCGCGGTCCCTTTAGAG 5'
      679 ||                                     EBI-681 |

```

55 Die Oligonukleotide EBI-680, -677, -678 und -682 wurden an 5'Ende phosphoryliert. EBI-678 und -680, EBI-677 und -679 sowie EBI-682 und -681 wurden paarweise auf 100°C erhitzt und langsam langsam abgekühlt (je 100 pMol in 20 µl). Die Doppelstrang-Oligonukleotide wurden vereint und ligiert. pRH 284T wurde mit SacI linearisiert, das 3'überhängende Ende durch Behandlung mit DNA-Polymerase I / Klenow

Fragment in Gegenwart von dGTP zu einem geraden Ende reduziert, und mit BamHI nachgeschnitten. Ca. 30 ng Vektor, 200 ng cDNA und 250 nMol Oligonukleotide wurden in 15 µl Lösung ligiert. Kompetente E.coli HB101 wurden mit der Ligasetlösung transformiert. Der resultierende Klon wurde pRH291 benannt (Fig.16).

### Beispiel 6

#### Vac-beta Expression in E.coli

##### a) Expressionsklon pRH212

Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pER103 verwendet (E.Rastl-Dworkin et al., Gene 21 (1983), 237-248). Der Vektor wurde mit HindIII linearisiert. Das 5'überhängende Ende wurde mit dATP und DNA-Polymerase I / Klenowfragment partiell eingefüllt, und der verbleibende Einzelstrangrest mit S1 Nuklease verdaut. Der Vektor wurde mit BamHI nachgeschnitten und das große Fragment isoliert (Fig.17). Aus dem Klon pRH203 wurde das 440 bp lange MaeIII-BamHI Fragment isoliert, das die Codons 13 bis 157 enthält. Das fehlende 5'Ende wurde durch Oligonukleotide ergänzt:

#### EBI-307

```

5'   CCATGGCTTGGTGGAAAGCTTGGATCGAACAGGAAGGT   3'
3'   GGTACCGAACCACCTTTTGAACCTAGCTTGTCCTTCCACAGTG 5'

```

#### EBI-306

Dabei wurden für E.coli optimale Codons verwendet (zB. R.Grantham et al., Nucleic Acids Res. 8 (1980), 1893-1912). Dieser Codonaustausch resultiert in einer neuen HindIII-Stelle bei Codon 5 bis 7. Das Oligonukleotide EBI-306 wurde phosphoryliert, mit EBI-307 hybridisiert und mit dem VAC-beta Fragment ligiert. Nach dem Nachschnitt mit BamHI wurde das 5'terminale VAC-Fragment in den vorbereiteten pER103 Vektor ligiert. Der entstehende Klon wurde pRH211 benannt. Um die für VAC-beta kodierende Region zu ergänzen, wurde aus dem Klon pRH201 das 1230 bp lange BamHI-SphI Fragment isoliert. Der ca. 200 bp lange pBR322 Abschnitt von BamHI bis SphI aus dem Plasmid pRH211 wurde entfernt und durch den entsprechenden VAC-cDNA Teil ersetzt. Es resultierte der Klon pRH212. Das EcoRI-BamHI Fragment, das den Trp-Promotor (S.marcescens), die ribosomale Bindungsstelle und den synthetisch hergestellten Beginn des VAC-beta Gens enthält, wurde durch Sequenzieren überprüft.

##### b) Expression von VAC-beta (pRH212)

Der Nachweis des plasmidkodierten VAC-beta erfolgte im Maxizell-system (A.Sancar et al., J. Bacteriol. 137 (1979), pp.692-693.). Ecoli CSR603 (F<sup>-</sup>, thr-1, leuB6, proA2, phr-1, recA1, argE3, thi-1, uvrA6, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, gyrA98 (nalA98), rpsL31, tsx-33, Lambda<sup>-</sup>, supE44) wurde mit pRH212 transformiert und bis zu einer OD<sub>600</sub> bei 37°C gezüchtet. 20 ml Kultur wurden in einer offenen Petrischale mit einer UV-Germicidlampe (15W) aus 50 cm Entfernung 5 Sekunden lang bestrahlt und anschließend 1 Stunde weiter inkubiert. Der Kultur wurden 100µg D-Cycloserin zugesetzt. Nach 16 Stunden wurden die Bakterien abzentrifugiert, zweimal mit Hershey-Salzlösung gewaschen (5,4g/l NaCl, 3,0 g/l KCl, 1,1 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 15 mg/l CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 0,2 g/l MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 0,2 mg/l FeCl<sub>3</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 87 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12,1 g/l Tris pH = 7,4), in 5 ml Hersheymedium resuspendiert (pro 100 ml Hersheysalze: 2,0 ml 20% Glukose, 0,5 ml 2% Threonin, 1,0 ml 1% Leucin, 1,0 ml 2% Prolin, 1,0 ml 2% Arginin, 0,1 ml 0,1% Thiamin-HCl) und mit 20 µg/ml Indolacrylsäure 2 Stunden inkubiert. Nach Zusatz von 5 µCi/ml <sup>35</sup>S-Methionin und weiterer Inkubation bei 37°C (1 Stunde) wurden die plasmidkodierten Proteine radioaktiv markiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und in 200 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen (Lämmli-Gel System, z.B. L.G.Davies et al.,

Methods in Molecular Biology (1986) pp.306-310). Die markierten Produkte wurden auf einem 15% Acrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und an Kodak X-Omat S Film exponiert. Als Referenz wurde gereinigtes VAC-alfa Protein mitlaufen gelassen und durch Anfärben sichtbar gemacht. VAC-alfa läuft etwas schneller als das pRH212 kodierte VAC-beta, wie es auch dem Molekulargewicht nach zu erwarten war. Die Expression von VAC-beta ist außerdem durch Zugabe des Induktors Indolacrylsäure stimulierbar (Fig. 18).

#### c) Expressionsklon pRH292

Der Expressionsvektor pRH284T wurde mit SacI linearisiert und die 3'überhängenden Ende mit DNA-Polymerase I / Klenowfragment und dGTP in gerade Enden übergeführt. Der Vektor wurde mit SalI nachgeschnitten, und das große Fragment isoliert. Das HindIII-SalI Insert des Klons pRH 212 wurde isoliert. 0,2 pMol des Oligonukleotidpaares

5' GCTTGGTGGAA 3' EBI-684  
3' CGAACCACCTTTCGA 5' EBI-685

wurde mit 0,2 pMol VAC-beta Insert und 0,015 pMol vorbereiteten pRH284T ligiert. E.coli HB101 wurde mit der Ligaselösung transformiert. Der resultierende Klon wurde pRH292 benannt (Fig.18).

#### Beispiel 7

#### Nachweis der Expression von Vac-alfa und Vac-beta in E.coli

##### a) Anzucht der Klone HB101/pRH291 und HB101/pRH292

Medien: 1) Vorkultur

10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
4 g/l Glucose  
9 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O  
1 g/l NH<sub>4</sub>Cl  
1 g/l KCl  
1 ml/l 1M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
100 mg/l Ampicillin

Start-pH = 7.2

##### 2) Hauptkultur

0,68 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,62 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O  
2,33 g/l KCl  
0,5 g/l NaCl  
0,53 g/l NH<sub>4</sub>Cl

- 1,23 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,011 g/l  $\text{CaCl}_2$
- 10 mg/l Thiamin.HCl
- 3,92 mg/l  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 5 0,72 mg/l  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,71 mg/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 1,5 mg/l  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 0,75 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 0,19 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- 10 0,51 mg/l  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 0,79 mg/l  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,73 mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,86 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 21 g/l Caseinhydrolysat (Merck Art.# 2238)
- 15 25 g/l Caseinhydrolysat (Sigma C9386)
- 100 mg/l Cystein
- 2 g/l Hefeextrakt
- 1 g/l Citronensäure
- 11 g/l Glucose. $\text{H}_2\text{O}$  (Start bzw. Feed)

20 700 ml Vorkulturmedium wurden mit dem Expressionsklon angeimpft und bei 37 °C unter Rühren (1000 rpm (= Umdrehungen pro Minute), Magnetstab) und Sauerstoffzufuhr (5 vvm (= vol/vol/min), Belüftungsfritte) 12 bis 15 Stunden inkubiert. 600 ml dieser Vorkultur wurden in einen Fermenter mit 12 l Hauptkulturmedium überführt. Die Hauptkultur wurde unter folgenden Bedingungen fermentiert:

- 25 Rührsystem: Blattrührer bei 1000 rpm
- Belüftung: 1.0 vvm
- Temperatur: 28 °C
- pH: 6,5 (25%  $\text{NH}_3$  zur Korrektur)

30 Während der Fermentation wurde die Glucosekonzentration gemessen. Bei Absinken auf 5 g/l wurde 10 g/l Glucose nachgefüllt. Alle weiteren Nachfütterungen zu je 10 g/l erfolgten bei einem Absinken der Glucosekonzentration im Fermenter auf 10 g/l. Fiel der Sauerstoffpartialdruck auf etwa 0,05 atm ab, wurde der Druck im Fermenter auf 0,3 bar erhöht. Nach 20 Stunden wurde auf 15 °C abgekühlt, die Biomasse  
35 über eine CEPA-Zentrifuge vom Nährmedium abgetrennt und bei -70 °C eingefroren.

#### 40 b) Nachweis des rekombination Vac-alfa bzw. Vac-beta Proteins

##### Lösungen:

##### 45 Probenpuffer:

- 125 mM Tris pH=6,8
- 50 4 % SDS
- 10 % Mercaptoäthanol
- 10 % Glyzerin
- 0,02 % Bromphenolblau

##### 55 Acrylamidgel:

Sammelpuffer:

3 % Acrylamid  
 0,1 % Bisacrylamid  
 5 125 mM Tris pH = 6,8  
 0,1 % SDS

10 Trennpuffer:

13,5 % Acrylamid  
 0,45 % Bisacrylamid  
 375 mM Tris pH = 8,8  
 15 0,1 % SDS

Laufpuffer:

20 14,4 g/l Glycin  
 3,025 g/l Tris  
 5 ml 20% SDS

25

Proteingel-Färbelösung:

0,1% Coomassieblau  
 30 50 % Methanol  
 10 % Essigsäure

35 Entfärbelösung:

5% Methanol  
 15% Essigsäure

40

Glycerinlösung:

7% Essigsäure  
 45 2% Glycerin

Transferpuffer:

50

10x Transferpuffer:

55 24,2 g/l Tris  
 112,6 g/l Glycin

## 1 x Transferpuffer:

100 ml/l 10x Transferpuffer

200 ml/l Methanol

5 1 ml/l Empigen

## Blocklösung:

10

1% Tween 20

1% BSA (Rinderserumalbumin)

10% fötales Kälberserum (GIBCO) in PBS

15

## PBS:

8 g/l NaCl

20 0,2 g/l KCl

1,15 g/l Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0,1 g/l MgCl<sub>2</sub>0,7 g/l CaCl<sub>2</sub>

25

## alkalische-Phosphatase-Puffer:

30 100 mM Tris pH = 9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl

Am Ende der Fermentation wurde die optische Dichte der Brühe bestimmt und ein Aliquot entnommen. Die Bakterien wurden in einer Eppendorfsentrifuge pelletiert, mit einer Konzentration von 20 OD<sub>600nm</sub> (optische Dichte bei 600 nm) in Probenpuffer resuspendiert und fünf Minuten bei 100 °C denaturiert. Unlösliche Anteile wurden durch Zentrifugieren in der Eppendorfsentrifuge pelletiert. 5 µl Aliquots wurden auf das Acrylamidgel geladen. Als Referenz dienten Expressionsklone, die ständig bei hoher Phosphatkonzentration gezüchtet worden waren (0,08 mM Phosphat). Unter diesen Bedingungen wurde der alkalische Phosphatasepromotor nicht aktiviert.

Die Proteine wurden bei 6,5 V/cm (Sammelgel) bzw. bei 13 V/cm (Trenngel) entsprechend dem Molekulargewicht aufgetrennt, bis der Bromphenolblaufarbstoff das Ende des Gels erreicht hatte. Eine Hälfte des Gels wurde mit Coomassieblau gefärbt. Dazu wurde das Gel 30 Minuten in der Färbelösung bewegt und anschließend eine Stunde in der Entfärbelösung behandelt. Zur besseren Entfernung des überschüssigen Farbstoff wurde ein mit Aktivkohle gefüllter Dialysenschlauch in die Entfärbelösung getaucht. Das Gel wurde abschließend 30 Minuten in der Glyzerinlösung behandelt und mittels eines Geltrockners getrocknet.

Die Proteine der zweiten Gelhälfte wurden auf ein Nitrozellulosefilter übertragen. Dazu wurde der Sandwich Whatman 3MM Papier-Gel-Nitrozellulose (Schleicher-Schuell, BA85)-Whatman 3MM Papier in einer Biorad-Transferapparatur in 1x Transferpuffer zwei Stunden einer Spannung von 150 V (Stromstärke 1000 mA) unter Kühlung ausgesetzt. Das Nitrozellulosefilter wurde über Nacht bei Raumtemperatur in 50 ml Blocklösung behandelt. Das Filter wurde drei Stunden in 5 ml Blocklösung / 1:1000 verdünntes Rabbit-Anti-Vac-Antiserum inkubiert und anschließend 30 Minuten in Fließwasser, sowie dreimal 15 Minuten in PBS / 1% Tween 20 (Merck-Schuchardt # 822184) gewaschen. Das Filter wurde in 20 ml Blocklösung mit einer 1:2000 Verdünnung des Anti-Rabbit IgG (Fc) alkaline phosphatase conjugate (Promega-ProtoBlot-Immunoscreening System) drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde wie oben in Fließwasser und PBS / 1% Tween 20 gewaschen. Der Nachweis des gebundenen Antikörper-alkalische Phosphatase-Konjugates erfolgte durch eine Farbreaktion (Promega-ProtoBlot Immunoscreening System). 66 µl NBT (50



mg/ml Nitro-blue-tetrazolium in 70% Dimethylformamid) und 33 µl BCIP (50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat in Dimethylformamid) wurden in 10 ml alkalische-Phosphatase-Puffer gelöst. Das Nitrozellulosefilter wurde bis zur Farbentwicklung in dieser Lösung inkubiert und anschließend 30 Minuten mit Fließwasser gewaschen. Das Filter wurde getrocknet und in Plastikfolie eingeschweißt.

5 In Figur 19 ist das Resultat wiedergegeben. "+Phosphat" ist die Kontrolle ohne Expression, "-Phosphat" zeigt die Expression von Vac-alfa (Klon HB101/pRH291) bzw. Vac-beta (Klon HB101/pRH292) Protein unter der Kontrolle des alkalischen Phosphatase Promotors. Sowohl Vac-alfa als auch Vac-beta Protein sind bereits auf dem gefärbten Gel zu erkennen. Die gebildete Menge an Vac-Proteinen beträgt überraschenderweise mindestens 20 mg/l/OD<sub>600nm</sub> Bakterienkultur.

10 Der Westernblot zeigt deutlich die angefärbte Vac-alfa Bande. Zusätzlich sind einige Proteine niedrigeren Molekulargewichts im Bereich bis 30 kD erkennbar, die möglicherweise durch proteolytische Spaltung am N-und/oder C-Terminus des Vac-alfa Proteins entstanden sind. Auffällig ist außerdem ein durch das Antiserum erkanntes Protein im Bereich kleiner 20 kD, das eventuell ein durch Proteolyse entstandenes Halbmolekül des Vac-alfa Proteins darstellen könnte. Überraschenderweise wurde auch Vac-beta durch das  
15 Anti-Vac-Antiserum erkannt. Da diese Bande wesentlich schwächer als die Vac-alfa Bande gefärbt ist, andererseits aber die Vac-beta Bande im Coomassie Blau gefärbten Gel in ihrer Intensität dem Vac-alfa entspricht, ist daraus zu schließen, daß die Erkennung des Vac-beta Proteins durch das Anti-Vac-Antiserum wesentlich schlechter als jene des Vac-alfa Proteins erfolgt.

20

### Beispiel 8

#### 25 Reinigung von rekombinationem VAC-alpha

Ausgangsmaterial: E.coli HB101/pRH 291.

Die Zellen waren zentrifugiert und bei -70 °C eingefroren worden.

30

#### a) Zell Homogenisierung und Extraktion

103,5g gefrorener Zellkuchen wurde in 500 ml eiskaltem Lyse-Puffer (100 mM TRIS/HCl, 50 mM EDTA und 200 mM NaCl, pH 7,5) suspendiert und mit einem Ultra-Turrax (5 kurze Impulse) zur Zerstörung von  
35 Klumpen behandelt. Die Suspension wurde danach 3-mal durch eine Manton-Gaulin Presse bei 6.000 psi geführt. Zuletzt wurde die Presse mit 300 ml Lyse-Puffer gespült. Zur homogenisierten Suspension wurde langsam eine 5%ige Lösung PEI (Polyethylenimin, Molekulargewicht 30.000-40.000), das mit 5 N HCl auf pH8 eingestellt worden war, bis zu einer Endkonzentration von 0,5% PEI, hinzugefügt. Nach 30-minütigem Rühren in einem Eisbad wurde die Lösung bei 9.000 g, 60 min. und 4 °C unter Verwendung einer  
40 Beckmann J2-21 Zentrifuge geklärt (roher Extrakt).

#### b) Ammoniumsulfat Fraktionierung:

45 Festes Ammoniumsulfat wurde langsam zum gerührten rohen Extrakt bis zu einer Sättigung von 30% (176 g/l) gegeben. Der Niederschlag wurde nach einer Nacht im Kühlraum entfernt. Der klare Überstand wurde langsam bis zu einer Sättigung von 65% mit festem Ammoniumsulfat versetzt (235 g/l Überstand) und zwei Stunden gerührt. Das Präzipitat wurde dann durch Zentrifugation bei 10.000 g 30 min. bei 4 °C gesammelt. Es wurde in 500 ml 20 mM TRIS/HCl + 50 mM NaCl, pH 7,4 gelöst und gegen denselben  
50 Puffer so lange dialysiert, bis alles Ammoniumsulfat entfernt worden war (bestimmt durch das Ausbleiben einer BaSO<sub>4</sub>-Bildung nach Zugabe von BaCl<sub>2</sub> zum Dialysat).

#### c) Chromatographie an DEAE-SEPHAROSE FAST FLOW

55

Das Dialysat wurde durch Zentrifugation geklärt und auf eine 160 ml DEAE-FF-Sepharose-Kolonne (Pharmacia), die mit 20 mM TRIS/HCl + 50 mM NaCl pH 7,4 equilibriert worden war, aufgetragen. Sobald der OD<sub>280nm</sub> des Eluates den Puffer-Level erreichte, wurde ein Gradient von 50 - 500 mM NaCl in 20 mM

TRIS/HCl pH 7,4 gefahren (insgesamt 10 Kolonnen-Volumina des linearen Gradienten).

Das Eluat wurde bei OD<sub>280nm</sub> kontrolliert und durch SDS-PAGE und Western Blot, unter Verwendung eines Kaninchen-Antiserums gegen Placenta-VAC hergestellt, wie für das Rinder-VAC in der EPA 0 181 465 beschrieben, und eines Schweine Anti-Kaninchen IgG gekuppelt an alkalischer Phosphatase, analysiert. VAC-enhaltende Fraktionen wurden gesammelt, wobei einige Fraktionen am Ende des Hauptpeaks verworfen wurden. Der VAC-Pool wurde unter Verwendung einer AMICON Ultrafiltrationszelle und eines PM 10-Typ Ultrafilters konzentriert.

10 d) Chromatographie an Sephacryl S-200 "High Resolution"

Eine Pharmacia K 26/100 Kolone (500 ml) wurde mit Sephacryl S-200 HR (Pharmacia) beladen und mit 20 mM Bis-TRIS/HCl + 100 mM NaCl pH 6,3 bei einer Durchflußrate von 15-20 ml/Stunde equilibriert. 6-15 ml Aliquots des konzentrierten DEAE-FF-Sepharose-Pools (total 87,4 ml) und anschließend der Bis-TRIS-Puffer (s.o.) wurden auf die Säule aufgetragen. Das Eluat wurde bei OD 280 nm überwacht. Der VAC repräsentierende Peak war der letzte auffällige Peak des UV-Profiles wie durch SDS-PAGE und Western Blots von Aliquots gezeigt werden konnte. Er wurde gesammelt, die Pools aller Versuche vereinigt (insgesamt 7) und gegen 20 mM Bis-TRIS/HCl pH 6,3 dialysiert.

20

e) Chromatographie an einer Q-SEPHAROSE-FAST-FLOW

Eine 40 ml Kolonne (K 16/20) einer Q-Sepharose-Fast-Flow (Pharmacia) wurde an das FPLC-System (Pharmacia) angeschlossen und mit 20 mM Bis-TRIS/HCl pH 6,3 equilibriert. Der dialysierte VAC-Pool wurde auf die Säule aufgetragen und so lange mit 20 mM BIS-TRIS gewaschen, bis der OD<sub>280nm</sub> des Eluates wieder den Puffer-Level erreicht hatte. Eine NaCl-Gradient in 20 mM Bis-TRIS/HCl pH 6,3 wurde zur Elution verwendet:

0-105 mM NaCl in 1 Kolonnen-Volumen ( 40 ml)

30 105-245 mM NaCl in 20 Kolonnen-Volumen (800 ml)

245-350 mM NaCl in 2 Kolonnen-Volumen ( 80 ml)

VAC konnte im letzten prominenten Peak des UV-Profiles identifiziert werden, der bei ungefähr 0.14 M NaCl eluierte. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE, Western Blot, Reverse HPLC und isoelektrischer Fokussierung bestimmt. Der VAC-Pool wurde bei -20 °C aufbewahrt.

35

Beispiel 9

40

Vergleich Rekombinantes/natürliches VAC $\alpha$

45

Verwendete Methoden:

a) Gelpermeations-HPLC

b) Reverse Phase HPLC

50

c) N-terminale Sequenzierung

d) Tryptic Peptid Map

e) SDS-Gelelektrophorese

f) Western Blot

g) Isoelektrische Fokussierung

55

Für den Vergleich wurde einerseits natürliches VAC, andererseits rekombinantes VAC- $\alpha$  verwendet. Im folgenden werden die Versuchsbedingungen für die einzelnen Analysemethoden beschrieben.

## a) Gelpermeations-HPLC

Säule: Waters Protein Pak I 125, 2 × (7,8 × 300 mm), 10 µm Teilchendurchmesser  
 Eluens: 0,5 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0, 0,04% Tween 20, 25% Propylenglykol  
 5 Fluß: 0,5 ml/min  
 Detektion: UV-Absorption, 214 nm

Die Chromatogramme von natürlichem und rekombinatem VAC-alfa zeigen den Hauptpeak des VAC-Monomeren bei einem Molekulargewicht von 34.000 bzw. 33.000. Daneben gibt es jeweils einen geringen  
 10 Anteil von früher eluierendem Dimeren des VAC. Die Eichung der Molekulargewichtsskala erfolgte über 4 Standardproteine. Die Säule trennt streng genommen nach Molekülgröße und nicht nach Molekulargewicht.

## b) Reverse Phase HPLC

15 Säule: Bakerbond WP C<sub>18</sub>, 4,6 × 250, 5 µm Teilchendurchmesser, 30 nm Porendurchmesser  
 Eluens A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser  
 Eluens B: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril  
 Gradient: 20% B für 2 min, 20 - 68% B in 24 min,  
 20 68% B für 10 min, 68 - 20% B in 1 min  
 Fluß: 1,0 ml/min  
 Detektion: UV-Absorption, 214 nm und 280 nm

25 Die Chromatogramme von natürlichem und rekombinatem VAC zeigen für VAC eine Retentionszeit von etwa 29 min. Die daneben vorliegenden sehr kleinen Peaks sind nur zum Teil Verunreinigungen der VAC-Probe. Alle mit BW gekennzeichneten Peaks stammen aus dem Blindwert der Säule.

## 30 c) N-terminale Sequenzierung

Sequenziert wurde ein über Reverse Phase HPLC entsalzter Peak von rekombinatem VAC-alfa. Die Sequenzierung erfolgte mit einem Gasphasen sequenator der Firma Applied Biosystems (Modell 470A) mit dem Programm 40APTH. Die Probe wurde in 50 µl 70% HCOOH gelöst. Am Sequenator wurden 2 × 25 µl  
 35 aufgetragen. Mit einer Ausgangsmenge von 2,3 nMol konnte bis zur Aminosäure 39 sequenziert werden. Es wurde 100%ige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz (aus natürlichem Protein und cDNA) gefunden. Zusätzliches N-terminales Met konnte nicht nachgewiesen werden (≤ 1%). Der N-Terminus liegt bei rekombinatem VAC-alfa frei und nicht blockiert vor wie bei natürlichem VAC.

## 40 d) Tryptic Peptid Map

Verglichen wurden natürliches VAC und rekombinantes VAC-alfa. Aus beiden Proben wurde VAC über Reverse Phase HPLC entsalzt, getrocknet und in 0,1% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gelöst. Für die Spaltung wurden 4  
 45 Gewichts% Trypsin (Worthington, TPCK behandelt, gelöst zu je 1 mg/ml in Wasser) zugesetzt, nach 6 Stunden Inkubation bei 37° C nochmals 4 Gewichts% Trypsin. Nach weiterer Inkubation über Nacht wurden die entstandenen Peptide über Reverse Phase HPLC getrennt. Die beiliegenden Chromatogramme (214 nm und 280 nm) zeigen ein praktisch identisches Peptidmuster.

Säule: Water µBondapak C<sub>18</sub>, 3,8 × 300 mm, 10 µm Teilchendurchmesser 10 nm Porendurchmesser  
 50 Eluens A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser  
 Eluens B: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril  
 Gradient: 0 - 55% B in 55 min, 55% B für 15 min, 55 - 0% B in 1 min  
 Fluß: 1,0 ml/min  
 Detektion: UV-Absorption, 214 nm und 280 nm

## e) SDS-Gelelektrophorese

SDS-Gelelektrophorese wurde weitgehend nach der Originalvorschrift von U.K. Laemmli durchgeführt (Natur 227, 680-685 (1979)). Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode von Oakley (Anal. Biochem. 105, 361-363 (1980)). Das erste Gel zeigt einen Vergleich zwischen natürlichem und rekombinantem VAC-alfa. Der Gehalt an dimerem VAC wurde durch Scannen mit einem Laserdensitometer quantifiziert und betrug 2% beim natürlichen und 4% beim rekombinanten VAC. Das zweite Gel zeigt nur rekombinantes VAC-alfa, aufgetragen mit und ohne DTT (Dithiothreitol, Reduktionsmittel). Daraus ist ersichtlich, daß das SDS-stabile Dimere offensichtlich über Disulfidbrücken gebunden ist, die mit DTT reduziert werden können.

Stammlösungen der Reagenzien15% Ammonium-persulfat-Lösung (APS)

150 mg Ammonium-persulfat werden in 1 ml dest. Wasser gelöst.

30% Acrylamid + 0,8% Bis Acrylamid

Acrylamid	Bis-acrylamid	Wasser auf
15 g	0,4 g	50 ml
30 g	0,8 g	100 ml
45 g	1,2 g	150 ml

Das Acrylamid wird in dem entsprechenden Wasservolumen gelöst und vor der Verwendung filtriert.

Trenngel-Puffer

1,5 M TRIS-HCl, 0,4% SDS (Sodium-dodecylsulfat), pH 8,8  
18,16 g TRIS + 0,4 g SDS mit konz. HCl auf pH 8,8  
einstellen und mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Stackinggel-Puffer

0,5 M TRIS-HCl, 0,4% SDS, pH 6,8  
6,04 g TRIS + 0,4 g SDS mit konz. HCl auf pH 6,8  
einstellen und mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Laufpuffer

25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, 0,005% Na-azid pH 8,5 12 g TRIS + 57,6 Glycin + 4 g SDS  
+ 0,2 g Natriumazid werden in ca. 3,5 l dest. Wasser gelöst, auf pH 8,5 eingestellt und auf 4,0 l aufgefüllt.  
Es empfiehlt sich die Leitfähigkeit des neuen Laufpuffers mit den vorhergehenden Chargen zu vergleichen.

0,05% Coomassie-Blue-Färbelösung

0,55 g Coomassie Brilliant Blue R 850 werden in 500 ml Methanol gelöst, 30 min gerührt und filtriert.  
Dazu gibt man 100 ml Eisessig und 500 ml dest. Wasser.

Entfärbelösung

a) Manuelles Entfärben

Die Entfärbelösung entspricht der Färbelösung ohne Farbstoff: 500 ml Methanol + 500 ml dest. Wasser +  
5 100 ml Eisessig

b) Elektrophoretisches Entfärben in 7,5% Essigsäure

10 4 x SDS Auftragepuffer (ca. 1 Monat haltbar)

Farbstoffkonzentrat:

15 Bromphenolblau 50 mg  
Glycerin 0,5 ml  
Wasser (dest.) auf 10 ml  
Die Lösung ist ca. 3 Monate haltbar.

20

Auftragepuffer:

Farbstoffkonzentrat 0,4 ml  
25 SDS 0,8 g  
Glycerin 4 g  
Wasser (dest.) auf 10 ml

30

1 x SDS Auftragepuffer

Verdünnung 1:4 des 4 x SDS Auftragepuffers mit dest. Wasser.

35

Silberfärbung nach Oakley

40

Reagenzien

45 Destainer:

Ethanol 200 ml  
Essigsäure (conc.) 62,5 ml  
Dest. Wasser auf 1000 ml

50

55

10% Glutardialdehyd-Lösung:

25% Glutardialdehyd-Lösung 20 ml bzw. 40 ml  
Dest. Wasser auf 50 ml bzw. 100 ml

5

Die Lösung muß im Kühlschrank aufbewahrt werden.

10 0,1 N ammoniakalische Silberlösung:

Erst direkt vor Gebrauch herstellen:

0,1 N Silbernitrat (16,9 g/l) 23 ml 46 ml

25% Ammoniaklösung 0,95 ml 1,9 ml

15 0,36% Natriumhydroxid (1,8 g/0,5 l) 10,5 ml 21 ml  
dest. Wasser auf 50 ml 100 ml

20 Entwickler-Lösung

Unmittelbar vor Gebrauch herstellen:

0,5% Citronensäure (1,25 g/250 ml) 5 ml

dest. Wasser 1 l

25 37% Formaldehyd 1 ml

Entfärbe-Lösung (Photo-Fixierer):

30

Kodak-Fixierer (Photolabor) Verdünnung 1:4 mit dest. Wasser. Die Verdünnung ist mehrfach verwendbar, jedoch nimmt die Dauer des Entfärbens nach häufigerer Verwendung zu.

35 2% Glycerin-Lösung:

23 g Glycerin 87% in 1 l dest. Wasser

40

Durchführung der Silberfärbung nach Oakley

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel an einer Ecke markiert und durchlief danach folgende Färbeschritte im Schüttler: - 30 min im Destainer-Bad

- 45 - 30 min in 20% Glutardialdehyd-Lösung (50 ml)  
- 30 min in fließendem Wasser oder über Nacht in ca. 2 l Wasser  
- 10 min in ammoniakalischer Silberlösung (50 ml)  
- 3 min in fließendem Wasser  
- ca. 5 min in Entwickler-Lösung

50

Der Entwicklungsvorgang wurde nicht nach einer exakten Zeitdauer beendet, sondern dann, wenn die Banden ausreichend gefärbt waren oder spätestens wenn sich der Hintergrund zu färben begann. Gestoppt wurde die Entwicklung durch

- 30 min Wässern der Gele (in einer Wanne oder unter Fließwasser)

55 Die Entwicklung dauerte auch noch an, wenn das Gel bereits im Wasser war! (Diffusionszeit).

Das Entfärben des Gels war nur dann erforderlich, wenn der Hintergrund zu stark gefärbt war!

- ca. 5-10 min in Kodak-Fixierer, bis ein optimaler Kontrast zwischen den Banden und dem Hintergrund

erreicht war. Achtung! Das Entfärben erfolgte auch noch nach unmittelbarem Abstoppen in fließendem Wasser (Diffusionszeit).

- 30 min in 2% Glycerin-Lösung

Danach konnte das Gel auf Filterpapier bei 80 ° C 1 Std. getrocknet werden.

#### f) Western Blot

Der immunologische Nachweis erfolgte für VAC mit rabbit anti VAC serum (1:1000 verdünnt) und mit  
 10 swine anti rabbit IgG (1:500 verdünnt), das mit Alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Zum Nachweis der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase wurden die Substrate BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat) und NBT (Nitro Blue Tetrazolium) eingesetzt. Die vergleichende Proteinfärbung auf der Nitrocellulose erfolgte mit Amidoschwarz.

#### Western-blotting im semi-dry Verfahren

#### 20 1. Materialien:

Semy-dry Electroblotter (Fa. Sartorius) SM 175 56; Filterpapier in der Größe des zu blottenden Gels; Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,45 µm) in Gelgröße;

#### Reagenzien

#### Anodenpuffer 1: pH 10,4

0,3 M TRIS      3,63 g/80 ml  
 20% Methanol      20 ml

#### Anodenpuffer 2: pH 10,4

25 mM TRIS      0,3 g/80 ml  
 20% Methanol      20 ml

#### Kathodenpuffer: pH 9,4

25 mM TRIS      0,3 g/80 ml  
 40 mM ε-Aminocaprinsäure      0,52 g/80 ml (MW 131,3)  
 20% Methanol      20 ml

#### Amidoschwarz-Protein-Färbemedium

0,5% (w/v) Amidoschwarz      0,5 g in 40 ml  
 50% Methanol      50 ml  
 10% Essigsäure      10 ml



Entfärber

Methanol - Wasser - Essigsäure

5 - 5 - 1

5

PBS (Phosphate buffered saline) 10x Konzentrat pH 7.2

10

136 mM Natriumchlorid 80 g  
 26 mM Kaliumchlorid 2 g  
 80 mM di-Natriumhydrogenphosphat 11,3 g  
 (80 mM di-Natriumhydrogenphosphat  $\cdot 12H_2O$  28,7 g)  
 14 mM Kalium-dihydrogenphosphat 2 g  
 mit dest. Wasser auffüllen auf 1 l  
 vor Gebrauch 1/10 verdünnen !!!

15

20

Blocking Puffer:

1% BSA  
 0,1% Tween 20  
 in 1x PBS

25

Waschpuffer:

1 x PBS  
 1 x PBS + 0,1% Tween 20  
 1 x PBS

30

35

Färbepuffer für Alkalische Phosphatase-Färbung:

pH 9,9  
 100 mM TRIS 1,22 g  
 100 mM Natriumchlorid 0,58 g  
 5 mM Magnesiumchlorid  $\cdot 6H_2O$  0,10 g  
 mit dest. Wasser auffüllen auf 100 ml

40

45

NBT (Nitro-Blue Tetrazolium) - Lösung

50 mg NBT (Fa. Sigma N-6876)/ml 70% Dimethylformamid

50

BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat) - Lösung

50 mg BCIP (Fa. Sigma B-8503)/ml in 100% Dimethylformamid

55

Färbemedium für Alkalische Phosphatase

Färbungspuffer 10 ml

BCIP 0,033 ml

5 NBT 0,065 ml

Antikörperreagenzien:

10 Rabbit anti VAC-Serum mit alkalischer Phosphatase konjugiert.

3. Durchführung des Blots

15 Das Blotten erfolgte bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche über 60 min

4. Nachweis der Proteine auf der Nitrocellulose-Membran

20

4.1. Proteinfärbung mit Amidoschwarz

25 Der für die Proteinfärbung vorgesehene Anteil der Nitrocellulose-Membran wurde abgeschnitten und 5 Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung gelegt. Danach wurde die mehrfach verwendbare Färbelösung abgegossen und überschüssige Färbelösung von der Nitrocellulose-Membran mit Wasser abgespült.

4.2 Immunologischer Nachweis

30

4.2.1 Blockierung der Nitrocellulose-Membran

35 Vor dem immunologischen Nachweis wurde die Nitrocellulose-Membran mindestens 60 min (oder auch über Nacht) mit 1% BSA in 1×PBS mit 0,1% Tween 20 blockiert.

4.2.2. Nachweis mit Enzym-markierten Antikörpern

40

Nach dem Blockieren wurde die Nitrocellulose-Membran mit rabbit anti VAC Serum (in geeigneter Verdünnung in Blockierungsmedium) 60 min inkubiert.

45 Danach wurde 3× gewaschen: 1× PBS, PBS mit 0,1% Tween, 20,1× PBS. Darauf erfolgte die Inkubation der Membran mit swine anti rabbit IgG, das mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war (ebenso in einer geeigneten Verdünnung in Blockierungsmedium über 60 min). Danach wurde erneut 3× mit PBS gewaschen wie oben angegeben.

4.2.3 Enzymatische Färbung des Blots

50

Die Nitrocellulose-Membran wurde in Färbemedium gelegt (für ein Minigel reichten 10 ml aus) und im Schüttler langsam bewegt, bis sich eine ausreichende Anfärbung der Banden zeigte. Die Färbung wurde durch Auswaschen des Färbemediums mit Wasser beendet, danach die Nitrocellulose-Membran an der Luft getrocknet.

55

5. Bewertung des Western-Blots

Die immunologisch/enzymatisch nachgewiesenen Banden des Blots wurden mit den Banden der Proteinfärbung des Blots und auch mit dem entsprechenden Bandenmuster der SDS-Elektrophorese verglichen und einander zugeordnet.

7. Isoelektrische Fokussierung

Der isoelektrische Punkt (pI) für rekombinantes VAC-alfa liegt mit 4,9 um 0,1 pH-Einheiten höher als für natürliches VAC (4,8).

Polyacrylamidgel-Isoelektrische Fokussierung (PAGIF oder IEF)Material und Reagenzien

Polyacrylamidgelplatten für Isoelektrische Fokussierung auf Folie aufpolymerisiert. (LKB - "PAGplate", SERVA - "Servalyt Precotes")

Elektrodenlösungen für die jeweiligen pH-Bereiche:

- 25 pH 3,5-9,5 (LKB-PAGplate)  
 Anodenlösung: 1 M Phosphorsäure  
 Kathodenlösung: 1 M Natronlauge  
 pH 5,5-8,5 (LKB-PAGplate)  
 30 Anodenlösung: 0,4 M HEPES (mit Na-azid)  
 Kathodenlösung: 0,1 M NaOH  
 pH 4,0-6,5 (LKB-PAGplate)  
 Anodenlösung: 0,5 M Phosphorsäure + 0,1 M Glutaminsäure  
 Kathodenlösung: 0,1 M Beta-Alanin (mit Na-azid)  
 35 pH 3,5-9,5 (SERVALYT-Precotes)  
 Anodenlösung: 25 mM Asparaginsäure + 25 mM Glutaminsäure  
 Kathodenlösung: 2 M Ethylendiamin + 25 mM Arginin Base + 37,5 mM Lysin Base  
 40 Kühlvermittler: Kerosin (Fa. SERVA)  
 Fixierlösung:  
 10% Trichloressigsäure (TCA) mit 5% Sulfosalicylsäure  
 0,05% Coomassie Blue Färbelösung  
 Entfärber: 500 ml Methanol + 500 ml Wasser + 100 ml Eisessig  
 45

Proben:

Die Proben sollen salzarm oder besser noch salzfrei sein. Höhere Salzkonzentration müssen vor der IEF gegen ca. 5-10 mM Puffer oder Wasser dialysiert werden. NaCl kann jedoch bis zu 100 mM enthalten sein, ohne daß die Lauffronten gestört werden.

Fixierung des IEF-Gels vor Proteinfärbung

Das Gel wurde ca. 20 min in die Fixierlösung gelegt, jedoch ohne dabei zu schütteln! (Es löste sich dabei leicht von der Folie ab) Danach wurde 5 min gewässert.

Proteinfärbung der IEF-Gele mit Coomassie Blue

Die fixierten Gele wurden ca. 2 Std. in Färbelösung gelegt und dabei nur sehr leicht bewegt.

Entfärben der IEF-Gele

Nach der Färbung wurde die überschüssige Färbelösung mit Wasser abgespült und durch häufiges Wechseln des Entfärbers das Gel entfärbt. Nach ausreichendem Entfärben wurde das Gel wieder gewässert, bis der Entfärber ausgewaschen war.

Trocknen der IEF-Gele

Die Gele wurden auf eine nasse, wasserdurchlässige Klarsichtfolie oder Dialysemembran gelegt, mit der wasserundurchlässigen Seite nach oben und 1 Std. bei 80 °C getrocknet.

Beispiel 10Biologische Aktivität von rekombinantem VAC

## A. Modifizierter Prothrombin Zeit Test (s.EPA 0 181 465)

Zitriertes, Plättchen freies Plasma (PFP) wurde in An- oder Abwesenheit von rekombinantem VAC (r-VAC) oder natürlichem VAC zwei Minuten bei 37 °C gerührt. Nach der Inkubation wurde eine Lösung aus brain tissue factor und  $\text{Ca}^{++}$  zugegeben. Die Fibrinbildung wurde beobachtet, die Gerinnungszeit optisch registriert. Die Ergebnisse sind in Fig. 33 dargestellt und belegen, daß r-VAC und VAC die Fibrinbildung dosisabhängig inhibieren. Die spezifischen Aktivitäten des r-VAC und des VAC bewegen sich in derselben Größenordnung.

## B. Thrombin Zeit Test (s. EPA 01 181 465)

Zitriertes PFP wurde in An- oder Abwesenheit von r-VAC oder VAC zwei Minuten bei 37 °C gerührt. Nach der Inkubation wurde Thrombin und  $\text{Ca}^{++}$  zugegeben. Die Fibrinbildung wurde optisch beobachtet. Sowohl r-VAC als auch VAC inhibieren nicht die Thrombin-induzierte Fibrinbildung wie aus Fig. 34 zu entnehmen ist. Folglich inhibieren sowohl r-VAC als auch VAC die Thrombinbildung, nicht jedoch die Thrombinwirkung.

## C. Faktor Xa-Bildung in Gewebefaktor-aktiviertem Plasma (s. EPA 0 181 465)

Zitriertes PFP wurde in An- oder Abwesenheit von r-VAC oder VAC zwei Minuten bei 37 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von "brain tissue factor" und  $\text{Ca}^{++}$  zum PFP gegeben, um so die Koagulation in Gang zu setzen. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und in einem Puffer 1000fach verdünnt. 10 µl dieser Lösung wurden zu 40 µl einer Mischung, die die nachfolgenden Komponenten des Prothrombinase-Komplexes enthielten, zugegeben.

0,6 nM Faktor Va

50 µM Phospholipide (80% Dioleoyl-phosphatidylcholin/20% Dioleoyl-phosphatidylserin).

1,0 µM Prothrombin

Nach einer Reaktionszeit von zwei Minuten wurde der Anteil an aktiviertem Prothrombin durch die

amidolytische Aktivität unter Verwendung des chromogenen Substrats S 2238 beurteilt. Die Menge an amidolytischer Aktivität, die so gemessen wurde, ist der Menge an aktivem Faktor  $X_a$  in dem PFP direkt proportional.

Nach 1000-facher Verdünnung bei Anwesenheit von VAC in dem PFP konnte keine Auswirkung auf die Prothrombin-Aktivierung beobachtet werden.

Eine typische Faktor  $X_a$ -Bildungskurve und die Auswirkungen von r-VAC und VAC sind in Fig. 35 dargestellt. Durch diese Ergebnisse kann festgestellt werden, daß r-VAC die Gewebefaktorinduzierte Faktor X-Aktivierung im Plasma, in dosisabhängiger Weise wie VAC inhibiert.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin indirekt, daß sowohl r-VAC als auch VAC den Faktor  $X_a$  direkt nicht in einer zeitabhängigen Weise inaktivieren. Diese Aussage kann aus der Form der Kurve hergeleitet werden. Nachdem ein Maximum erreicht ist, beginnt die Menge an aktivem Faktor  $X_a$  in dem PFP, einer Kinetik Pseudo 1. Ordnung folgend, abzunehmen. Diese Abnahme resultiert vermutlich aus der Inaktivierung des Faktors  $X_a$  durch Antithrombin III. Die Geschwindigkeitskonstante Pseudo 1. Ordnung, die aus diesen Daten berechnet wurde, beträgt ca.  $0,25 \text{ min}^{-1}$  und ändert sich nicht bei Abwesenheit von r-VAC und VAC.

Diese Daten belegen eindeutig, daß r-VAC VAC-Aktivität zeigt. Obwohl die spezifische Aktivität von r-VAC in diesem Koagulationstest identisch ist mit der von VAC und obwohl r-VAC Faktor  $X_a$  und Thrombin direkt nicht inaktiviert, wurden zusätzlich noch Untersuchungen zur r-VAC-Bindung an Phospholipide durchgeführt, um zweifelsfrei die Zugehörigkeit der VAC-Aktivität zum r-VAC zu demonstrieren.

Die Bindung von r-VAC und VAC an eine Phospholipid-Doppelschicht, die aus Dioleoylphosphatidylcholin und Dioleoylphosphatidylserin (80%/20%) besteht, wurde durch Verwendung eines automatischen Ellipsometers bestimmt. Dies Verfahren wurde von Cuypers et al. in J. Biol. Chem. 258 (1983), 2426-2431 beschrieben.

Ein typisches Ergebnis dieser Studie gibt Fig. 36 wieder. Sowohl r-VAC als auch VAC zeigen identische Bindungskinetik an die Doppelschicht, wenn sie in einer Konzentration von  $1 \mu\text{g VAC/ml}$  dieser Doppelschicht zugesetzt wurden. Die Bindung erfolgt in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  und ist, wie durch die Zugabe von EDTA gezeigt werden konnte, reversibel.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß r-VAC biologisch aktiv ist und von natürlichem VAC nicht zu unterscheiden ist.

30

#### Beispiel 11

#### 35 **Konstruktion Tetracyclin-resistenter VAC-alpha und VAC-beta Expressionsvektoren (pGN25, pGN26)**

$1 \mu\text{g pAT163}$  wurde in  $50 \mu\text{l}$  Lösung mit EcoRI geschnitten. Die Enzymaktivität wurde durch Erhitzen auf  $70^\circ \text{C}$  zerstört, und die überhängenden Enden durch Zusatz von DNA-Polymerase I/Klenow Fragment (PolIK) (5 units) und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (je  $20 \mu\text{M}$  Endkonzentration) in einer fill in Reaktion begründet. Nach Erhitzen auf  $70^\circ \text{C}$  zur Zerstörung der PolIK Aktivität wurde die DNA mit Äthanol ausgefällt. Die linearisierte DNA wurde in  $50 \mu\text{l}$  mit PvuI nachgeschnitten.

pRH291 bzw. pRH292 wurden zunächst mit SphI linearisiert und das 3' überhängende Ende durch die 3' exonukleolytische Aktivität der PolIK in Gegenwart von dGTP abgebaut. Nach Fällen der DNAs wurden diese mit PvuI nachgeschnitten. Die Fragmente aus allen drei Verdauen wurden auf einem Agarosegel getrennt und die entsprechenden Fragmente eluiert (pAT153: 3032 bp, pRH291: 1987 bp, pRH292: 2607 bp).  $50 \text{ ng pAT153}$  Fragment wurden mit  $50 \text{ ng pRH291}$  bzw. pRH 292 Fragment versetzt und in  $10 \mu\text{l}$  ligiert.  $100 \mu\text{l}$  kompetenter E.coli HB101 wurden mit  $5 \mu\text{l}$  der Ligaselösung versetzt und transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Agar, der  $100 \mu\text{g/ml}$  Ampicillin enthält. Von den entstandenen Klonen wurden einige auf LB-Agar mit  $12,5 \mu\text{g/ml}$  Tetracyclin ausgestrichen. Die darauf wachsenden Klone wurden zur Herstellung von Plasmid DNA verwendet. Die in einer Minipräparation hergestellte Plasmid-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und so die Richtigkeit der Konstruktion überprüft. Jeweils ein Klon wurde ausgewählt und mit pGN25 (VAC-alpha) oder pGN26 (VAC-beta) bezeichnet.

E.coli HB101/pGN25 bzw. HB101/26 wurden, wie in Beispiel 7 beschrieben, einer Fermentation unterzogen, wobei diesmal anstelle des Amicillins  $5 \text{ mg/l}$  Tetracyclin in der Vorkultur verwendet wurden. Während der Hauptfermentation wurden Aliquote entnommen und auf einem 15% Acrylamid/0,1% SDS Gel

nach Lämmli untersucht. Es wurde kein Unterschied zu den Fermentationen von E.coli HB101/pRH291 bzw. HB101/pRH292 festgestellt. Aus der Biomasse der Fermentation wurde VAC-alpha und VAC-beta gereinigt. Die Proteinanalyse ergab ebenfalls keinen Unterschied zu den entsprechenden rekombinanten Proteinen aus den Fermentationen der Klone HB101/pRH291 und HB101/292.

## Beispiel 12

### Reinigung von rekombinantem VAC- $\beta$

Ausgangsmaterial: E.coli HB101/pRH 292.

Die Zellen waren zentrifugiert und bei -70 °C eingefroren worden.

#### a) Zell Homogenisierung und Extraktion

100 g gefrorener Zellkuchen wurde in 500 ml eiskaltem Lyse-Puffer (100 mM TRIS/HCl, 50 mM EDTA und 200 mM NaCl, pH 7,5) suspendiert und mit einem Ultra-Turrax (5 kurze Impulse) zur Zerstörung von Klumpen behandelt. Die Suspension wurde danach 3-mal durch eine Manton-Gaulin Presse bei 6.000 psi geführt. Zuletzt wurde die Presse mit 300 ml Lyse-Puffer gespült. Zur homogenisierten Suspension wurde langsam eine 5%ige Lösung PEI (Polyethylenimin, Molekulargewicht 30.000-40.000), das mit 5 N HCl auf pH8 eingestellt worden war, bis zu einer Endkonzentration von 0,5% PEI, hinzugefügt. Nach 30-minütigem Rühren in einem Eisbad wurde die Lösung bei 9.000 g, 60 min. und 4 °C unter Verwendung einer Beckmann J2-21 Zentrifuge geklärt (roher Extrakt).

#### b) Chromatographie an Silica

Silica Catalyst Carrier, Grade 953W (Grace GmbH, Worms, BRD) wurde in destilliertem Wasser geklärt und in eine Chromatographiesäule von 5 cm Durchmesser und 20 cm Höhe gefüllt. Nach Äquilibrierung mit Lys-Puffer wurde der rohe Extrakt auf die Säule aufgetragen und mit 3 l Lys-Puffer gewaschen. VAC- $\beta$  wurde mit einem Lineargradienten von Tetraethylammoniumchlorid in Lys-Puffer (0-1 M in 200 ml Puffer) eluiert. Fraktionen des Eluats wurden durch SDS-PAGE auf VAC- $\beta$  unter Verwendung von Referenz-Material kontrolliert. VAC- $\beta$  enthaltende Fraktionen wurden gesammelt.

#### c) Chromatographie an DEAE-SEPHAROSE FAST FLOW

Die gesammelten Silica-Fraktionen wurden gegen 20 mM TRIS/HCl pH 8,4 dialysiert und auf eine 175 ml DEAE-FF-Sepharose-Kolonne (26 x 330 mm, Pharmacia), die mit 20 mM TRIS/HCl pH 8,4 equilibriert worden war, aufgetragen. Die Kolonne wurde mit 500 ml Pufferlösung gewaschen und VAC- $\beta$  mit einem Gradienten von 0-500 mM NaCl in 875 ml Pufferlösung (5 Kolonnen Volumen) eluiert. Das Eluat wurde bei 280 nm kontrolliert und durch SDS-PAGE, unter Verwendung eines Referenz-Materials analysiert. VAC- $\beta$  enthaltende Fraktionen wurden gesammelt und unter Verwendung einer AMICON Ultrafiltrationszelle und eines PM 10-Typ Ultrafilters konzentriert.

#### d) Chromatographie an Sephacryl S-200 "High Resolution"

Eine Pharmacia K 26/100 Kolonne (500 ml) wurde mit Sephacryl S-200 HR (Pharmacia) beladen und mit 20 mM Bis-TRIS/HCl + 100 mM NaCl pH 8,4 bei einer Durchflußrate von 120 ml/Stunde equilibriert. 4 ml Aliquots des konzentrierten DEAE-FF-Sepharose-Pools wurden auf die Säule aufgetragen und die Durchflußrate auf 60-80 ml/Stunde reduziert. Das Eluat wurde bei 280 nm überwacht. Der VAC- $\beta$  repräsentierende Peak war der einzige Peak des UV-Profiles. Er wurde gesammelt, wobei hochmolekulare Verunreinigungen, die ebenfalls im UV-Profil detektierbar waren verworfen wurden. Das gereinigte VAC- $\beta$  wurde durch SDS-PAGE analysiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle: Reinigung von rekombinantem VAC- $\beta$ 

Ausgangsmaterial: 100 g gefrorener Zellkuchen

	<u>Volumen(ml)</u>	<u>mg Protein/ml<sup>x)</sup></u>	<u>mg total</u>
10 ROHEXTRAKT	810	16,1	13.040
SILICA DURCHFLUSS	2270	0,35	795
VAC-beta SILICA POOL	380	5,0	1.900
VAC-beta DEAE-FF-POOL	120	2,6	312
15 DEAE-FF-POOL KONZENTRAT	4	58	232
VAC-beta SEPHACRYL-POOL	33,5	2,2	74

x) Protein bestimmt durch BIO-RAD Protein Assay (Standard: bovine serum albumin)

Beispiel 13Analytik und Charakterisierung von VAC-beta

Als In Process Kontrolle zwischen den einzelnen Reinigungsschritten wurde die SDS-Gelelektrophorese verwendet. Die genaue Durchführung dieser Analyse erfolgte gleich wie bei den Endkontrollen und ist dort beschrieben. Eine Serie der während einer Reinigung erhaltenen SDS-Gele ist im Beispiel 12 (Reinigung von VAC-beta) enthalten.

Als Endkontrollen und zur Charakterisierung des gereinigten Proteins wurden die folgenden Methoden verwendet:

- a) Gelpermeations-HPLC
- b) Reverse Phase HPLC
- c) Aminosäureanalyse
- d) N-terminale Sequenzierung
- e) SDS-Gelelektrophorese
- f) Isoelektrische Fokussierung

## a) Gelpermeations-HPLC

Säule: Waters, Protein Pak I 125, 2 x (7,8 x 300 mm), 10  $\mu$ m Teilchendurchmesser, Raumtemperatur  
 Eluens: 0,5 m Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0, 0,04% Tween 20, 25% Propylenglykol  
 Flußrate: 0,5 ml/min  
 Detektion: UV-Absorption, 214 nm, 0,5 AUFS

Das Chromatogramm (Fig. 40) von gereinigtem VAC-beta zeigt den Hauptpeak des VAC-beta Monomeren bei einem Molekulargewicht von 29.000, daneben ist eine geringe Menge dimeres VAC-beta (M' etwa



50.000) nachweisbar. Diese Werte für das Molekulargewicht liegen relativ weit unterhalb des erwarteten Wertes (M 37.000), was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß die hier verwendete Gelpermeations-Säule nach der Molekülgröße bzw. -gestalt trennt und nicht nach dem Molekulargewicht

5

#### b) Reverse Phase HPLC

- Säule: Bakerbond WP C<sub>18</sub>, 4,6 x 250 mm, 5 µm Teilchendurchmesser, 30 nm Porendurchmesser,  
 10 Raumtemperatur  
 Eluens A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser  
 Eluens B: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril  
 Gradient: 20% B für 2 min, 20 - 68% B in 24 min, 68% B für 10 min, 68 - 20% B in 1 min  
 Flußrate: 1 ml/min  
 15 Detektion: UV-Absorption, 214 nm, 0,5 AUFS

- Das Chromatogramm (Fig. 41) stammt direkt aus dem Eluat der letzten Reinigungsstufe und zeigt hauptsächlich den Peak des oxidierten VAC-beta (2 Disulfidbrücken, t<sub>R</sub> = 26,6 min). Daneben sind etwa 9% reduziertes VAC β (t<sub>R</sub> = 27,4 min) sowie einige kleinere Peaks von restlichen Verunreinigungen nachweisbar.  
 20 Das Chromatogramm (Fig. 42) zeigt dieselbe VAC-beta Probe nach 2 Stunden Inkubation in 3 M Harnstoff, 0,05 M Dithiothreitol. Das Protein liegt hauptsächlich in der reduzierten Form (t<sub>R</sub> = 27,4 min) vor.

#### c) Aminosäureanalyse

25

Gereinigtes VAC-beta wurde über Reverse Phase HPLC (Methode siehe unter b) entsalzt. Der Hauptpeak von VAC-beta wurde in einem Hydrolyseröhrchen gesammelt und getrocknet.

Die Hydrolyse erfolgte mit 6 N Salzsäure (mit 1% Phenol) in der Gasphase (110 °C, 22 Stunden).

- Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mit einem Aminosäureanalysator ((Typ 6300, Fa. Beckman)  
 30 über eine Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin.

Die Aminosäureanalyse (Fig. 43) einer VAC-beta Probe weist eine Gesamtabweichung gegenüber der theoretischen Zusammensetzung von 6.56% auf.

#### 35 d) N-terminal Sequenzierung

Gereinigtes VAC-beta wurde über Reverse Phase HPLC (Methode siehe unter b) entsalzt. Der Hauptpeak von VAC-beta wurde gesammelt und getrocknet.

- Der Rückstand wurde in 75 µl 0,1% Trifluoressigsäure gelöst und direkt für die Sequenzierung  
 40 verwendet.

Die Sequenzierung erfolgt mit einem Gasphasensequenzator der Fa. Applied Biosystems (Modell 470 A9) mit dem Programm 39apth.

- Mit einer Ausgangsmenge von etwa 1 nM konnte bis zur 39. Aminosäure sequenziert werden. Es wurde 100%ige Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz gefunden. N-terminales Methionin wurde offensicht-  
 45 lich zu 100% abgespalten. (Fig. 44)

#### e) SDS-Gelelektrophores

- 50 Die SDS-Gelelektrophoresen wurden weitgehend nach der Originalvorschrift von U.K. Lämmli durchgeführt. Für in Process Kontrollen wurden VAC-beta-Proben vor dem Auftragen mit Dithiothreitol versetzt und aufgekocht. Endkontrollen erfolgten sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen.

Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Blue.

- 55 Fig. 45 zeigt ein SDS-Gel von VAC-beta Proben.

Spur 1 und 10: Molekulargewichtsmarker

Spur 2 und 3: In Process Probe von VAC-beta mit und ohne DTT (Dithiothreitol)

Spur 4 und 6: 10 µg VAC-beta nicht reduziert

Spur 5 und 7: 10 µg VAC-beta mit DTT reduziert

Spur 8 und 9: 1 µg VAC-beta nicht reduziert

VAC-beta ohne Reduktionsmittel ist als Doppelbande nachweisbar. Die intensivere untere Bande bei M etwa 36.000 ist die oxidierte Form, die obere Bande bei M etwa 38.000 die reduzierte Form von VAC-beta. Die mengenmäßige Verteilung der beiden Formen ist besser aus den Spuren 8 und 9 ersichtlich.

Nach Zugabe von DTT als Reduktionsmittel ist daher nur mehr die obere Bande sichtbar (siehe Spur 3, 5 und 7). Da die Spuren 4 bis 7 stark überladen sind, sind neben den VAC-beta Banden auch einige Banden von restlichen Verunreinigungen sichtbar.

#### f) Isoelektrische Fokussierung

Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blue.

Die isoelektrische Fokussierung Fig. 46 (3.3.1988/51) von weitgehend gereinigtem VAC-β zeigt, daß VAC-β direkt aus der letzten Reinigungsstufe (Spur 2 und 3) zwei Hauptbanden bei pH 5,35 bzw. 5,45 ergibt. Der isoelektrische Punkt (pI) von VAC-β ist damit deutlich basischer als der von VAC-α (pI = 4,9), was den Erwartungen entspricht da VAC-β weniger saure Aminosäuren enthält.

Nach der Reduktion mit Dithiothreitol (Spur 4 und 5) ist die Hauptbande bei pH 5,45 stark angereichert. Diese stellt offensichtlich die reduzierte Form von VAC-β dar.

#### Beispiel 14

#### Biologische Aktivitäten von VAC-α und VAC-β

##### 1. Effekt von VAC-α und VAC-β auf die Prothrombinase Aktivität.

Der Prothrombinase Komplex wurde aus gereinigten bovinen Koagulationsfaktoren und Phospholipiden rekonstituiert. Er bestand aus 0,3 nM Faktor Xa, 0,6 nM Faktor Va, 1 µM Prothrombin, 2 µM Phospholipid Vesikeln (25% Dioleoyl-phosphatidylserin, 75 % Dioleoyl-phosphatidylcholin) und 3 mM CaCl<sub>2</sub>.

Prothrombin Aktivierung wurde folgendermaßen gemessen: Faktor Xa, Va, Phospholipide, Ca<sup>++</sup> und variierende Mengen VAC wurden zwei Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Aktivierung des Prothrombin wurde durch dessen Zugabe gestartet. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben der Mischung in folgendem Puffer aufgenommen:

50 mM TRIS/HCl, 175 mM NaCl, 0,5 mg/ml BSA, 20 mM EDTA und 0,23 mM S2238. Amidolytische Aktivität wurde bei 405 nm verfolgt. Aus einer Standardkurve, die mit bekannten Mengen Thrombin erstellt worden war, wurde anschließend die Menge an aktiviertem Prothrombin bestimmt. Fig. 47 gibt das Ergebnis wieder.

##### 2. Phospholipase Inhibitor Aktivitäten von VAC

E.coli wurde metabolisch mit <sup>3</sup>H-Ölsäure markiert und weiterbehandelt wie beschrieben (Davidson, F.F. et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1690-1705). Die E.coli Membran Präparation enthielt 198 µm Phospholipide mit einer spezifischen Aktivität von  $1,2 \times 10^4$  cpm/nMol Phospholipid. Diese Membran Präparation diente als Phospholipasesubstrate in dem Assay, der wie folgt durchgeführt wurde: 103 µl 0,1 M TRIS/HCl, pH 8,0, unterschiedliche Mengen an VAC und Ca<sup>++</sup> enthaltend und 10 µl E.coli Membranen wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 wurden 10 µl 0,1 M TRIS/HCl, pH 8,0, 2 ng bovine Pankreas Phospholipase A<sub>2</sub> enthaltend zugegeben. Nach zwei Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2N HCl und 50 µl 0,1 M TRIS/HCl pH 8,0 das 100 ng/ml BSA enthielt, gestoppt. Die Mischung wurde bei 14.000 rpm fünf Minuten zentrifugiert. Die Menge an freigesetzter <sup>3</sup>H-Ölsäure wurde durch Szintillationszählung des Überstandes bestimmt. Prozent Inhibition der Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität wurde folgendermaßen berechnet:

$$100\% - [(cpm_{pla + vac} - cpm_{blank}) / (cpm_{pla} - cpm_{blank})] \cdot 100\%$$

Hierbei bedeutet  $\text{cpm}_{\text{pl}a + \text{VAC}}$ ,  $\text{cpm}_{\text{pl}a}$  und  $\text{cpm}_{\text{blank}}$  die cpm, die in den Überständen der Mischungen, entweder Phospholipase A<sub>2</sub> und VAC, Phospholipase A<sub>2</sub> oder VAC enthaltend, gemessen wurden. Die Ergebnisse finden sich in den Figuren 48, 49, 50 und 51.

### Beispiel 15

#### Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen VAC- $\alpha$

##### 1. Kopplung von VAC- $\alpha$ an "keyhole limpet" -Hämocyanin (KLH)

VAC- $\alpha$  wurde folgendermaßen kovalent an "keyhole limpet" - Hämocyanin (KLH; SIGMA chemical company, St. Louis, USA, Katalog-Nummer H-2133) gekoppelt.

##### 1.1 VAC- $\alpha$ /KLH Präparation 1:

0,51 mg VAC- $\alpha$  wurden in 1,5 ml isotoner phosphat-gepufferter Natriumchlorid-Lösung pH 7,2 (im folgenden "PGS" abgekürzt) gelöst und mit 0,12 ml einer KLH-Lösung Glutardialdehydlösung wurden 0,017 ml einer 25%igen Glutardialdehydlösung wurden hinzugefügt und das Gemisch 45 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde über Nacht gegen 1 l PGS dialysiert. Portionen dieser Lösung wurden bei -20° C gelagert.

##### 1.2 VAC- $\alpha$ /KLH Präparation 2:

2,54 mg VAC- $\alpha$  wurden in 2 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 gelöst und mit 0,3 ml KLH-Lösung (siehe 1.1) gemischt. 0,023 ml einer 25%igen Glutardialdehyd-Lösung wurden hinzugefügt und das Gemisch 45 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde über Nacht gegen 1 l PGS (siehe 1.1) dialysiert. Portionen dieser Lösungen wurden bei -20° C gelagert.

## 2. Immunisierung

Eine 10 Wochen alte weibliche Balb/c-Maus wurde folgendermaßen immunisiert:

5	Immunisierung	Tag	VAC- $\alpha$ /KLH Präparation	Adjuvans
	1	1	1 (0.15 ml)	komplett
10	2	24	1 (0.15 ml)	inkomplett
	3	49	1 (0.15 ml)	inkomplett
	4	188	2 (0.1 ml)	inkomplett
15	5	225	2 (0.1 ml)	inkomplett
	6	258	2 (0.1 ml)	inkomplett
	7	265	2 (0.1 ml)	inkomplett
20	8	271	2 (0.1 ml)	inkomplett
	9	272	2 (0.1 ml)	inkomplett
	10	273	2 (0.1 ml)	kein

25 Alle Immunisierungen, ausgenommen die letzte, erfolgten durch intraperitoneale Injektion einer Emulsion gleicher Volumina von Antigen-Lösung und Freund'schem Adjuvans.

## 3. Zellfusion und Hybridom-Selektion

30 Peritoneale Zellen wurden aus Balb/c Mäusen durch Spülen mit einer sterilen Saccharose-Lösung (110 g/l in deionisiertem Wasser) gewonnen, durch Zentrifugation gesammelt und in Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium mit Natrium-Penicillin G (100 Einheiten/ml) und Streptomycin (50 Einheiten/ml) (im folgenden "Kulturmedium" genannt) mit 10% fötalem Kalbsserum in einer Zelldichte von etwa  $3.5 \times 10^4$  Zellen/ml suspendiert. 0,1 ml - Aliquots wurden in die Vertiefungen von Gewebekulturplatten (96 Vertiefungen pro Platte) pipettiert: die Platten wurden über Nacht inkubiert.

Einen Tag nach der letzten Immunisierung wurde die Maus in Äther anästhesiert und getötet. Die Milz wurde aseptisch entnommen und die Milzzellen wurden durch vorsichtiges Schaben auf einem Stahlgitter gewonnen. Die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium suspendiert und durch Zentrifugation gesammelt.

40 P3 $\times$ 63Ag8,653 Maus-Myelomzellen (Kerney et al., J. Immunol. 123, 1548, 1979) wurden in stationärer Suspensionskultur in Kulturmedium mit 10% fötalem Kalbsserum gezüchtet. Etwa  $10^8$  Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt. Die Myelomzellen wurden zu den Milzzellen zugegeben; die gemischte Zellpopulation wurde neuerlich durch Zentrifugation gesammelt und in 3 ml einer sterilen Lösung von 40% Polyäthylenglycol 4000 (Merck, Darmstadt BRD, Katalognummer 9727) in Kulturmedium suspendiert. Die Suspension wurde 1,5 Minuten bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt und anschließend 1 Minute stehen gelassen. 3 ml Kulturmedium wurden unter ständigem Schütteln über einen Zeitraum von 1,5 Minuten zugetropft, die Suspension dann eine Minute stehengelassen. Anschließend wurden weitere 6 ml Kulturmedium unter Schütteln über 1,5 Minuten zugetropft und 1 Minute stehen gelassen. Die Suspension wurde in der Folge unter Schütteln mit 12 ml Kulturmedium mit 10% fötalem Kalbsserum tropfenweise während drei Minuten verdünnt, dann 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt und in 150 ml Kulturmedium mit 20% fötalem Kalbsserum, Thymidin ( $1,6 \times 10^{-5}$  M), Hypoxanthin ( $10^{-4}$  M) und Aminopterin ( $4 \times 10^{-7}$ ) (in der Folge "HAT-Medium" genannt) suspendiert. Je 0,1 ml dieser Suspension wurden in die Vertiefungen einer Zellkultur-Platte pipettiert, in die am Vortag peritoneale Zellen eingesetzt worden waren (siehe oben); die Platten wurden drei Tage inkubiert.

55 0,075 ml HAT-Medium wurden zugegeben, anschließend wurden die Kulturen weitere 8 Tage inkubiert. Alle Inkubationen der Zellkulturen wurden bei 37°C in einer wasserdampf-gesättigten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> in Luft ausgeführt.

3. Screening nach Hybridomen, die Antikörper gegen VAC- $\alpha$  produzieren.

Das Screening wurde mit Hilfe eines Enzym-Immuntest durchgeführt. Die Vertiefungen einer für Enzym-Immuntests geeigneten Mikrotiter-Platte wurden mit VAC- $\alpha$  beschichtet (0,005 mg/ml in 0,1 M Natriumkarbonat-Puffer pH 9,6; über Nacht bei 2-8°C oder eine Stunde bei 37°C). Die Lösung wurde entfernt und die Platten wurden einmal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Freie Protein-Bindungsstellen wurden mit einer Lösung von Rinderserum-Albumin (5  $\mu$ /ml in isotoner phosphat-gepufferter Kochsalzlösung pH 7,2 [PGS]) eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert, anschließend einmal mit Wasser gewaschen. In jede Vertiefung wurden 0,1 ml Hybridom-Überstand zugegeben und 2-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Überstände entfernt, die Vertiefungen wurden dreimal mit Wasser gewaschen. 0,05 ml einer Lösung von mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Kaninchen-Antikörpern gegen Maus-Immunglobuline (Dakopatts, Kopenhagen, Dänemark, Katalognummer P161; 1:2000 in PGS mit 5 mg/ml Rinderserumalbumin wurden zugegeben und drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend dreimal mit Wasser gewaschen. 0,1 ml einer frisch hergestellten Mischung gleicher Volumina von Lösungen von ortho-Phenylendiamin (8,65 mg/ml in 0,1 M Kaliumzitat pH 5), Natrium Perborat (3,75 mg/ml in 0,1 M Kaliumzitat pH 5) und Wasser wurden zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,1 ml 4 N. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugegeben. Die optische Dichte der Lösungen wurde in einem Mehrkanal-Photometer für Mikrotiter-Platten bei 492 nm bestimmt. Zellkultur-Medium mit 20% fötalem Kalbsserum wurde als negative Kontrolle, Serum der immunisierten Maus (in PGS mit 5 mg/ml Rinderserumalbumin verdünnt) als positive Kontrolle verwendet. Kulturüberstände aller Hybridom-Kulturen wurden in zwei unabhängigen Tests 11 bzw. 13 Tage nach der Zellfusion getestet. Kulturen, die in beiden Tests ein positives Signal gaben, wurden in weiteren Screening-Test untersucht, in denen sowohl unbeschichtete als auch mit VAC- $\alpha$  beschichtete Testplatten eingesetzt wurden. Zwei der Kulturen gaben wiederholt positive Ergebnisse mit beschichteten, nicht aber mit unbeschichteten Platten. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Probe	Optische Dichte bei 492 nm			
	Experiment 1		Experiment 2	
	beschichtet	unbeschichtet	beschichtet	unbeschichtet
	unbeschichtet	beschichtet	unbeschichtet	beschichtet
Mausserum 1: 100	0,291	0,152	1,735	0,475
Hybridom VAA-8	1,061	0,102	1,169	0,108
Hybridom VAA-9	0,552	0,187	0,387	0,109
Negative Kontrolle	0,032	0,031	0,071	0,055

Beispiel 16:

- 5 Herstellung der Expressionsvektoren pRH281/n und pRH281/nt (n = 5,6,7,8,9)

Der in der EPA Nr. 186 098 beschriebene Expressionsvektor pRH100 hat verschiedene Nachteile:

- a) konstanter und nicht optimaler Abstand zwischen ribosomaler Bindungsstelle (RBS) und Translationsstart-ATG  
 10 b) Zwischen RBS und ATG gibt es einige C's und G's  
 c) die -35 Region des *Serratia marcescens* trp Promotors ist verglichen mit der *E.coli* Sequenz nicht optimal (TTGACT statt TTGACA)  
 d) die EcoRI-Stelle vor dem Promotor ist überflüssig.  
 Es wurde ein Satz von Oligonukleotiden mit folgender Sequenz synthetisiert:

```

15      :Trp-1->  ::Trp-3->
      AATTGACGCTGATGGCTAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACATTGCC
20      CTGCGACTACCGATTTTGTAACACGTTTTTCTCCCAACTGTAACGG
      <-Trp-2::
                                :-->Transkriptionsstart
                                ::Trp-5->
25      TTCGCGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCTCGAGACGGTAAGG
      AAGCGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGAGCTCTGCCATTCC
                                <-Trp-4::
                                -----
30                                RBS
                                SstI      ClaI
                                -----EcoRI -----
35                                :
      AGGTTTAATATGAGCTCGAATTCAT
      TCCAAATTATACTCGAGCTTAAGTAGC
40      ----      ---      <-Trp-6:
      RBS      Translationsstart-ATG
      : n=5 :
  
```

- 45 Jeweils 100 pMol der Oligonukleotide Trp-2, Trp-3, Trp-4 und Trp-5 wurden in 10 µl phosphoryliert. Nach der Reaktion wurden äquimolare Mengen (je 100 pMol) Trp-1 und Trp-2, Trp-3 und Trp-4 sowie Trp-5 und Trp-6 vereint, auf 100 °C erhitzt und durch langsames Abkühlen hybridisiert. Die Oligonukleotidpaare wurden vereint und in 55 µl ligiert. pAT153 wurde mit EcoRI und ClaI doppelt geschnitten und das große Vektorfragment isoliert. 50 ng pAT153 Fragment wurden mit 20 pMol synthetischer Promotor DNA in 20 µl  
 50 ligiert. Kompetente *E.coli* HB101 wurden mit dem entstandenen Plasmid transformiert. Von den entstandenen Kolonien wurden einige ausgesucht, die Plasmid DNA isoliert und der Bereich der eingefügten DNA durch Sequenzieren überprüft. Ein Plasmid wurde ausgewählt und mit pRH281/5 bezeichnet, wobei 5 die Zahl der Nukleotide zwischen der RBS und dem Translationsstart-ATG symbolisiert.

- 55 Ausgehend von diesem Expressionsvektor wurde das XhoI-SstI Insert durch folgende Oligonukleotidpaare wie oben beschrieben ersetzt:

a)	TCGAGACGGTAAGGAGGTTTAAATATGAGCT	Trp-9
	CTGCCATTCTCCAAATTTATAC	Trp-10
b)	TCGAGACGGTAAGGAGGTTTAAATAATGAGCT	Trp-11
	CTGCCATTCTCCAAATTTATTAC	Trp-12
c)	TCGAGACGGTAAGGAGGTTTAAAATAATGAGCT	Trp-13
	CTGCCATTCTCCAAATTTTATTAC	Trp-14
d)	TCGAGACGGTAAGGAGGTTTAAAAATAATGAGCT	Trp-15
	CTGCCATTCTCCAAATTTTATTAC	Trp-16

Die resultierenden Expressionvektoren wurden pRH281/6 pRH281/7, pRH281/8 und pRH281/9 benannt. Diese neuen Expressionsvektoren weisen folgende Eigenschaften auf:

a) die originale EcoRI-Stelle von pAT153 wurde zerstört.  
b) die -35 Region des *Serratia marcescens* Promotors ist jener des trp-Promotors aus *E.coli* angepaßt.

c) vor der artifiziellen ribosomalen Bindungsstelle befindet sich eine singuläre XhoI-Stelle, die das Einbringen einer anderen RBS erlaubt.

d) Das G des Translationsstart-ATG ist die erste Base einer Sst I (= SacI) Stelle. Durch Schnitt mit SstI und anschließendem Abbau des 3' Überhangs entsteht ein gerades Ende, an das eine beliebige cDNA oder ein Gen ligiert werden kann. Beginnt diese mit der ersten Base des zu translatierenden Bereichs, erfolgt eine korrekte Transkription und Translation in *E.coli*.

e) 3'seitig dieser SstI Stelle befinden sich eine singuläre EcoRI, ClaI und HindIII Stelle, die für ein gerichtetes Klonieren einer zu exprimierenden DNA verwendet werden kann. Außerdem können auch die singulären Schnittstellen im Tetracyclin Resistenzgen zu diesem Zweck gebraucht werden.

f) Die Variation /5 bis /9 erlaubt, den optimalen Abstand zwischen RBS und ATG für das jeweilige Gen zu bestimmen.

Manchmal ist es für eine optimale Expression und für die Stabilität des Plasmides nötig, hinter das exprimierte Gen einen Transkriptionsterminator zu setzen (R.Gentz et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78 (1981), 4936-4940). Das HindIII-SalI Fragment des pRH281/5 wurde durch Doppelverdau herausgeschnitten. Das fehlende Stück wurde durch ein den phoA Transkriptionsterminator (H.Shuttleworth et al., Nucl.Acids Res. 14 (1986), 8689; C.N.Chang et al., Gene 44 (1986), 121-125) enthaltendes Oligonukleotidpaar ersetzt:

:EBI-456->

AGCTTGGATCCGTCGACCGCGCCCGGCAGTGAATTTTCGCTGCCGGGTGG

ACCTAGGCAGCTGGCGCGGGCCGTCACCTAAAAGCGACGGCCCCACC

:-----

-----BamHI -----

HindIII SalI



TTTTTTTGCTGC

AAAAAACGACGAGCT

&lt;-EBI-459:

10 pMol des hybridisierten Oligonukleotidpaares wurden mit 100 ng HindIII-Sall doppelt geschnittenen pRH281/5 Vektorteil in 20 µl ligiert. Nach Transformation von E.coli HB101, Isolierung der Plasmid-DNA einiger Kolonien und deren Sequenzüberprüfung wurde ein Plasmid ausgewählt und mit pRH281/5T bezeichnet.

In analoger Weise wie oben beschrieben wurde aus diesem Plasmid die Reihe pRH281/6T, pRH281/7T, pRH281/8T und pRH281/9T unter Verwendung der Oligonukleotide Trp-9 bis Trp-16 hergestellt.

### Beispiel 17:

#### 20 Mutanden des VAC-alpha

Folgende Mutationen wurden an der VAC-alpha DNA durchgeführt (die Aminosäurenummerierung und die Basennummerierungen beziehen sich auf die Figur 4):

25 a) Verkleinerung des VAC-Moleküls: VAC-alpha besitzt eine vierfach repetierte 67/68 Aminosäuren lange Sequenz mit einer singulären N-terminalen Extension (Fig.6). Drei verkürzte Formen wurden hergestellt:

i) Deletion der Aminosäuren 2 bis 18: Eliminierung der singulären N-terminalen Extension, Met-1 sitzt vor Ala-19.

30 ii) Deletion der dritten und vierten Repeat: das Arg-161 Codon wurde zu einem Stoppcodon mutiert.

iii) Deletion der N-terminalen singulären Extension, sowie der ersten und zweiten Repeat. Met-1 sitzt vor Ala-165.

b) Ein möglicher Angriffspunkt beim proteolytischen Abbau des VAC-alpha stellt vielleicht das Arg-161 dar. Diese Aminosäure wurde daher mutiert:

35 i) Arg-161 zu Glu-161.

ii) Arg-161 zu Gln-161.

c) Durch Einbau einer Faktor Xa-Schnittstelle zwischen der zweiten und dritten Repeat kann vielleicht ein der Inhibition der Koagulationskaskade entkommender Faktor Xa an VAC gebunden werden und/oder dieses sogar in zwei funktionelle Hälften zerlegen, und so die Wirksamkeit von VAC-alpha erhöhen. Es wurde daher folgende Mutation durchgeführt: Asp-168 zu Glu-168, Glu-169 zu Gly-169 und Ala-170 zu Arg-170. Daraus ergibt sich die Faktor Xa Erkennungssequenz Ile-Glu-Gly-Arg.

d) Um die Frage der Wichtigkeit des Cysteins-316 für die biologische Wirksamkeit zu beantworten, und zugleich seine Beteiligung an der Dimerenbildung zu überprüfen, wurde

i) Cys-316 zu Ser-316 und

45 ii) Cys-316 zu Val-316

mutiert.

e) Um den Einfluß der N-terminalen Extension zu studieren, wurde diese Extension (Ala-2 bis Ala-19) ersetzt durch die jeweiligen N-Termini aus Lipocortin I, Calpactin I und VAC-beta.

50 Als erster Schritt wurde aus dem Expressionsvektor pRH291 der Expressionsvektor pGN10 hergestellt. Dieser Expressionsvektor besitzt die Phagen Lambda cII RBS an Stelle der in pRH291 verwendeten STII-RBS. pRH291 wurde mit XhoI und KpnI doppelt geschnitten. Das große Fragment wurde isoliert. 40 pMol des Oligonukleotidpaares EBI-725/EBI-727 mit folgender Sequenz:

EBI-725 TCGAGTTATCTAAGGAAATACTTACATATGGCACAGGTTCTCAGAGGTAC

55 EBI-727 CAATAGATTCCCTTTATGAATGTATACCGTGTCCAAGAGTCTC

XhoI

RBS

ATG

KpnI

wurden in 6 µl hybridisiert und anschließend mit ca. 200 ng pRH291/großes Fragment in 20 µl Lösung ligiert. Kompetente E.coli HB101 wurden transformiert. Von den entstandenen Ampicillin- resistenten Kolonien wurden die Plasmide einiger Klone isoliert und die Sequenz des neuen Stücks DNA überprüft. Ein Klon wurde ausgewählt und mit pGN10 bezeichnet.

5 Als Vorbereitung für die Mutagenesereaktionen wurde aus pGN10 das PvuII-SphI Fragment isoliert. PvuII schneidet im phoA Promoter Teil, SphI in der nicht translatierten Region der VAC-alpha cDNA. Das die VAC-alpha cDNA enthaltende Fragment wurde gereinigt und in die SmaI/SphI doppelt geschnittene Doppelstrangform des M13mp18 kloniert. Von den entstandenen Plaques nach Transformation von E.coli JM101 wurde eine ausgewählt, und die M13/VAC-alpha Einzelstrang DNA in größerem Maßstab präpariert.

10 Die Mutationsreaktionen wurden mit Hilfe des "Oligonucleotide- directed in vitro mutagenesis system" (Amersham, code RPN.2322) unter genauer Einhaltung des beigefügten Protokolls durchgeführt.

Nach der Sequenzüberprüfung der entstandenen Mutanten wurde die entsprechende Doppelstrangform der rekombinanten M13mp8/VAC-alpha Phagen-DNA in Form einer Plasmid Minipräparation isoliert. Mit Ausnahme der Mutation mit EBI-977 (ClaI-Stelle auf Nt.105-110) wurden diese DNAs mit XhoI und SphI  
15 doppelt geschnitten, und das die VAC-cDNA enthaltende Fragment isoliert. Ca. 50 ng dieses Fragments wurden mit 50 ng XhoI-SphI doppelt geschnittenem pRH281/5 Vektorteil in 10 µl Lösung ligiert und das entstandene Plasmid in kompetente E.coli HB101 transformiert. Die Plasmide einiger resultierender Kolonien wurden isoliert und durch Restriktionsenzymverdau auf die Richtigkeit der Konstruktion überprüft. Außerdem wurde die letztendlich ausgewählte Kolonie im Labormaßstab fermentiert, und die Proteine des  
20 Bakteriums einer Westernblotanalyse unter Verwendung des Rabbit-anti-VAC- Antiserums unterzogen.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die hergestellten Mutanten:

25	Mutations- Oligo	resultierender Expressionsvektor	Eigenschaften des neuen Klons
30	EBI-1051	pGN42	Deletion von Ala-2 bis Arg-18
35	EBI-964	pGN29	Translationsstop auf 161 (Deletion von Arg-161 bis Asp-320)
40	EBI-1105	pGN43	Deletion von Ala-2 bis Asp-164
45			
50			
55			

EBI-1103	pGN44	Arg-161 zu Gln-161
EBI-1104	pGN45	Arg-161 zu Glu-161
EBI-960	pGN30	Faktor Xa-Schnittstelle auf 167 bis 170
EBI-961	pGN41	Cys-316 zu Ser-316
EBI-959	pGN46	Cys-316 zu Val-316
EBI-977	pGN31	ClaI-Stelle auf Nt.105 bis 110

Die Sequenzen der Mutationsoligos sind (5'→3'):

EBI-1051: CCGAAGAGTTTCTGCATCAGCCATATGTAAGTATTTCTTAG  
 EBI-964: AATTCCAGCATCAGGGTCTTAGTTAGCCTGAAGGAGAAC  
 EBI-1105: AGCTTCATCAATTCCAGCCATATGTAAGTATTTCC  
 EBI-1103: AATTCCAGCATCAGGGTCCTGGTTAGCCTGAAGGAGAAC  
 EBI-1104: AATTCCAGCATCAGGGTCTTCGTTAGCCTGAAGGAGAAC  
 EBI-960: GCCTGAGCATCTTGTTCAACTTGACGACCTTCAATTCCAGCA  
 TCAGGGTCTCTG  
 EBI-961: CGTTAGTCATCTTCTCCTGAGAGCAGCAGAAGAGC  
 EBI-959: CGTTAGTCATCTTCTCCCACGAGCAGCAGAAGAGC  
 EBI-977: CAACAGAGTCAGGATCGATTCTCCTCATCTGTGCCC

Die angegebenen Sequenzen sind komplementär zu der DNA-Sequenz in Figur 4, was durch die Klonierung der VAC-alpha cDNA in den M13mp18 bedingt ist.

Die mutierte DNA mit der ClaI-Stelle auf Nt.105 bis 110 wurde mittels EcoRI-HindIII Doppelverdau aus der Doppelstrangform des rekombinanten M13mp18 freigesetzt, isoliert und in EcoRI-HindIII doppelt geschnittenen Bluescribe M13+ (Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pGN31 genannt. pGN31 wurde mit ClaI und XhoI doppelt geschnitten, und das große Fragment isoliert. Durch Einsatz verschiedener Oligonukleotidpaare wurde der für Lipocortin I (K.-S. Huang et al. Cell 46 (1986), 191-199), Calpactin I (=Lipocortin II, K.-S. Huang et al. Cell 46 (1986), 191-199) und VAC-beta spezifische N- Terminus eingefügt:

## a) Lipocortin I-spezifischer N-Terminus

5 :EBI-972-> :Start Lipocortin  
 TCGAGAGGTTGAGGTGATTTTATGGCAATGGTATCAGAATTCCTCAAGCA  
 CTCCAACCTCCACTAAAATACCGTTACCATAGTCTTAAGGAGTTCGT

10 :  
 GGCCTGGTTTATTGAAAATGAAGAGCAGGAATATGTTCAAACCTGTGAAGT  
 CCGGACCAAATAACTTTTACTTCTCGTCCTTATACAAGTTTGACACTTCA

15 ::EBI-977->  
 CATCCAAAGGTGGTCCCGGATCAGCGGTGAGCCCCTATCCTACCTTCAAT  
 20 GTAGGTTTCCACCAGGGCCTAGTCGCCACTCGGGGATAGGATGGAAGTTA

<-EBI-988::  
 :Fortsetzung VAC-alpha  
 25 CCATCCTCGGATGCAGAACTCTTCGGAAGGCTATGAAAGGCTTGGGCAC  
 GGTAGGAGCCTACGTCTTTGAGAAGCCTTCCGATACTTTCCGAACCCGTG

30 AGATGAGGAAT  
 TCTACTCCTTAGC  
 <-EBI-982:

35 JE 1 pMol EBI-978 und EBI-988 wurden gemeinsam in 6 µl phosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 100°C gestoppt, jeweils 1 pMol EBI-972 und EBI-982 zugesetzt, die Lösung nochmals auf 100°C erhitzt und langsam abgekühlt. Die beiden Oligonukleotidpaare wurden durch Zugabe von Ligase miteinander ligiert. Danach wurde ca. 1 µg pGN31 ClaI-XhoI großes Fragment zugesetzt, das Volumen auf 40 µl erweitert und ligiert. Nach der Transformation von kompetenten E.coli JM101 wurden einige Kolonien ausgesucht und deren Plasmide gemäß dem Bluescribe-Protokoll von Stratagene mit Hilfe eines Helperphagen in Einzelstrang-DNA überführt und sequenziert. Eines der richtigen Plasmide wurde ausgewählt und mit pGN32 bezeichnet. Mit XhoI und HindIII (befindet sich hinter der SphI-Stelle in der Multiklonierstelle des Bluescribe M13+) wurde das Insert aus dem Vektor geschnitten und gereinigt. pRH281/5 wurde ebenfalls mit XhoI und HindIII doppelt verdaut und das Vektorfragment isoliert. 200 ng pGN32 Insert und etwa 50 ng pRH281/5-Vektorteil wurden in 20 µl ligiert. Die DNA wurde in E.coli HB101 transformiert, und die Plasmid-DNA einiger Ampicillin-resistenter Klone durch Restriktionsenzymanalyse auf die Richtigkeit der Konstruktion überprüft. Außerdem wurde die letztendlich ausgewählte Kolonie im Labormaßstab fermentiert, und die Proteine des Bakteriums einer Westernblotanalyse unter Verwendung des Rabbit-anti-VAC- Antiserums unterzogen. Das resultierende Expressionsplasmid für das Lipocortin I/VAC-alpha-Hybrid wurde pGN35 genannt.

## b) Calpactin I spezifischer N-Terminus:

:EBI-990->                      Start Calpactin  
 TCGAGAGGTTGAGGTGATTTTATGTCTACTGTTACGAAATCCTGTGCAA  
 CTCCAACCTCCACTAAAATACAGATGACAAGTGCTTTAGGACACGTT

GCTCAGCTTGGAGGGTGATCACTCTACACCCCAAGTGCATATGGGTCTG  
 CGAGTCGAACCTCCCACTAGTGAGATGTGGGGGTTACGTATACCCAGAC

&lt;-

::EBI-1001->                      :Fortsetzung VAC-alpha  
 TCAAAGCCTATACTAACTTTGATGCTGAGCGGGATGCAGAACTCTTCGG  
 AGTTTCGGATATGATTGAAACTACGACTCGCCCTACGTCTTTGAGAAGCC  
 EBI-985::

AAGGCTATGAAAGGCTTGGGCACAGATGAGGAAT  
 TTCCGATACTTTCCGAACCCGTGTCTACTCCTTAGC

&lt;-EBI-994:

Die Herstellung des rekombinanten Bluescribe M13+ Plasmids pGN33, seine Sequenzüberprüfung und das Umklonieren in den Expressionsvektor pRH281/5 erfolgte analog zu der für das Lipocortin I - Hybrid beschriebenen Prozedur. Das resultierende Expressionsplasmid (Calpactin I/VAC-alpha-Hybrid) wurde pGN36 genannt.



ATG GCA CAG GTT CTC AGA GGC ACT GTG ACT GAC TTC CCT GGA TTT  
5 GAT GAG CGG GCT GAT GCA XXX ACT CTT CGG AAG GCT ATG AAA GGC  
TTG GGC ACA GAT GAG GAG AGC ATC CTG ACT CTG TTG ACA TCC CGA  
10 AGT AAT GCT CAG CGC CAG GAA ATC TCT GCA GCT TTT AAG ACT CTG  
TTT GGC AGG GAT CTT CTG GAT GAC CTG AAA TCA GAA CTA ACT GGA  
15 AAA TTT GAA AAA TTA ATT GTG GCT CTG ATG AAA CCC TCT CGG CTT  
20 TAT GAT GCT TAT GAA CTG AAA CAT GCC TTG AAG GGA GCT GGA ACA  
AAT GAA AAA GTA CTG ACA GAA ATT ATT GCT TCA AGG ACA CCT GAA  
25 GAA CTG AGA GCC ATC AAA CAA GTT TAT GAA GAA GAA TAT GGC TCA  
30 AGC CTG GAA GAT GAC GTG GTG GGG GAC ACT TCA GGG TAC TAC CAG  
CGG ATG TTG GTG GTT CTC CTT CAG GCT AAC AGA GAC CCT GAT GCT  
35 GGA ATT GAT GAA GCT CAA GTT GAA CAA GAT GCT CAG GCT TTA TTT  
CAG GCT GGA GAA CTT AAA TGG GGG ACA GAT GAA GAA AAG TTT ATC

40

45

50

55

ACC ATC TTT GGA ACA CGA AGT GTG TCT CAT TTG AGA AAG GTG TTT  
 5 GAC AAG TAC ATG ACT ATA TCA GGA TTT CAA ATT GAG GAA ACC ATT  
 GAC CGC GAG ACT TCT GGC AAT TTA GAG CAA CTA CTC CTT GCT GTT  
 10 GTG AAA TCT ATT CGA AGT ATA CCT GCC TAC CTT GCA GAG ACC CTC  
 TAT TAT GCT ATG AAG GGA GCT GGG ACA GAT GAT CAT ACC CTC ATC  
 15 AGA GTC ATG GTT TCC AGG AGT GAG ATT GAT CTG TTT AAC ATC AGG  
 AAG GAG TTT AGG AAG AAT TTT GCC ACC TCT CTT TAT TCC ATG ATT  
 20 AAG GGA GAT ACA TCT GGG GAC TAT AAG AAA GCT CTT CTG CTG CTC  
 TGT GGA GAA GAT GAC TAA  
 25

entspricht, wobei XXX für GAA oder GAC steht und degenerierte Formen dieser DNA.

3. DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Formel

30 ATG GCC TGG TGG AAA GCC TGG ATT GAA CAG GAG GGT GTC ACA GTG  
 35 AAG AGC AGC TCC CAC TTC AAC CCA GAC CCT GAT GCA GAG ACC CTC  
 TAC AAA GCC-ATG AAG GGG ATC GGG ACC AAC GAG CAG GCT ATC ATC  
 40 GAT GTG CTC ACC AAG AGA AGC AAC ACG CAG CGG CAG CAG ATC GCC  
 AAG TCC TTC AAG GCT CAG TTC GGC AAG GAC CTC ACT GAG ACC TTG  
 45 AAG TCT GAG CTC AGT GGC AAG TTT GAG AGG CTC ATT GTG GCC CTT  
 50  
 55



5 ATG TAT CCG CCA TAC AGA TAC GAA GCC AAG GAG CTG CAT GAC GCC  
 ATG AAG GGC TTA GGA ACC AAG GAG GGT GTC ATC ATT GAG ATC CTG  
 GCC TCT CGG ACC AAG AAC CAG CTG CGG GAG ATA ATG AAG GCG TAT  
 10 GAG GAA GAC TAT GGG TCC AGC CTG GAG GAG GAC ATC CAA GCA GAC  
 ACA AGT GGC TAC CTG GAG AGG ATC CTG GTG TGC CTC CTG CAG GGC  
 15 AGC AGG GAT GAT GTG AGC AGC TTT GTG GAC CCG GCA CTG GCC CTC  
 CAA GAC GCA CAG GAT CTG TAT GCG GCA GGC GAG AAG ATT CGT GGG  
 20 ACT GAT GAG ATG AAA TTC ATC ACC ATC CTG TGC ACG CGC AGT GCC  
 25 ACT CAC CTG CTG AGA GTG TTT GAA GAG TAT GAG AAA ATT GCC AAC  
 AAG AGC ATT GAG GAC AGC ATC AAG AGT GAG ACC CAT GGC TCA CTG  
 30 GAG GAG GCC ATG CTC ACT GTG GTG AAA TGC ACC CAA AAC CTC CAC  
 AGC TAC TTT GCA GAG AGA CTC TAC TAT GCC ATG AAG GGA GCA GGG  
 35 ACG CGT GAT GGG ACC CTG ATA AGA AAC ATC GTT TCA AGG AGC GAG  
 40 ATT GAC TTA AAT CTT ATC AAA TGT CAC TTC AAG AAG ATG TAC GGC  
 AAG ACC CTC AGC AGC ATG ATC ATG GAA GAC ACC AGC GGC GAC TAC  
 45 AAG AAC GCC CTG CTG AGC CTG GTG GGC AGC GAC CCC TGA

entspricht und degenerierte Formen dieser DNA.

50 4. DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Formel

55

ATG GCA CAG GTT CTC AGA GGC ACT GTG ACT GAC TTC CCT GGA TTT

5

GAT GAG CGG GCT GAT GCA XXX ACT CTT CGG AAG GCT ATG AAA GGC

TTG GGC ACA GAT GAG GAG AGC ATC CTG ACT CTG TTG ACA TCC CGA

10

AGT AAT GCT CAG CGC CAG GAA ATC TCT GCA GCT TTT AAG ACT CTG

TTT GGC AGG GAT CTT CTG GAT GAC CTG AAA TCA GAA CTA ACT GGA

15

AAA TTT GAA AAA TTA ATT GTG GCT CTG ATG AAA CCC TCT CGG CTT

20

TAT GAT GCT TAT GAA CTG AAA CAT GCC TTG AAG GGA GCT GGA ACA

AAT GAA AAA GTA CTG ACA GAA ATT ATT GCT TCA AGG ACA CCT GAA

25

GAA CTG AGA GCC ATC AAA CAA GTT TAT GAA GAA GAA TAT GGC TCA

AGC CTG GAA GAT GAC GTG GTG GGG GAC ACT TCA GGG TAC TAC CAG

30

CGG ATG TTG GTG GTT CTC CTT CAG GCT AAC AGA

35

entspricht, wobei gegebenenfalls XXX für GAA oder GAC steht und/oder nach dem letzten AGA ein Stop-Codon steht und degenerierte Formen dieser DNA.

5. DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Formel

GAC CCT GAT GCT

40

GGA ATT GAT GAA GCT CAA GTT GAA CAA GAT GCT CAG GCT TTA TTT

45

50

55

CAG GCT GGA GAA CTT AAA TGG GGG ACA GAT GAA GAA AAG TTT ATC  
 5 ACC ATC TTT GGA ACA CGA AGT GTG TCT CAT TTG AGA AAG GTG TTT  
 GAC AAG TAC ATG ACT ATA TCA GGA TTT CAA ATT GAG GAA ACC ATT  
 10 GAC CGC GAG ACT TCT GGC AAT TTA GAG CAA CTA CTC CTT GCT GTT  
 GTG AAA TCT ATT CGA AGT ATA CCT GCC TAC CTT GCA GAG ACC CTC  
 15 TAT TAT GCT ATG AAG GGA GCT GGG ACA GAT GAT CAT ACC CTC ATC  
 AGA GTC ATG GTT TCC AGG AGT GAG ATT GAT CTG TTT AAC ATC AGG  
 20 AAG GAG TTT AGG AAG AAT TTT GCC ACC TCT CTT TAT TCC ATG ATT  
 25 AAG GGA GAT ACA TCT GGG GAC TAT AAG AAA GCT CTT CTG CTG CTC  
 TGT GGA GAA GAT GAC TAA  
 30

entspricht, wobei gegebenenfalls vor dem ersten GAC ein Initiationscodon steht und degenerierte Formen dieser DNA.

6. DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Formel

35 ATG GCC TGG TGG AAA GCC TGG ATT GAA CAG GAG GGT GTC ACA GTG  
 AAG AGC AGC TCC CAC TTC AAC CCA GAC CCT GAT GCA GAG ACC CTC  
 40 TAC AAA GCC ATG AAG GGG ATC GGG ACC AAC GAG CAG GCT ATC ATC  
 45 GAT GTG CTC ACC AAG AGA AGC AAC ACG CAG CGG CAG CAG ATC GCC  
 AAG TCC TTC AAG GCT CAG TTC GGC AAG GAC CTC ACT GAG ACC TTG  
 50

55

AAG TCT GAG CTC AGT GGC AAG TTT GAG AGG CTC ATT GTG GCC CTT

5

ATG TAT CCG CCA TAC AGA TAC GAA GCC AAG GAG CTG CAT GAC GCC

ATG AAG GGC TTA GGA ACC AAG GAG GGT GTC ATC ATT GAG ATC CTG

10

GCC TCT CGG ACC AAG AAC CAG CTG CGG GAG ATA ATG AAG GCG TAT

GAG GAA GAC TAT GGG TCC AGC CTG GAG GAG GAC ATC CAA GCA GAC

15

ACA AGT GGC TAC CTG GAG AGG ATC CTG GTG TGC CTC CTG CAG GGC

20

AGC AGG

entspricht, wobei gegebenenfalls nach dem letzten AGG ein Stopcodon steht und degenerierte Formen dieser DNA.

7. DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Formel

25

GAT GAT GTG AGC AGC TTT GTG GAC CCG GCA CTG GCC CTC

30

CAA GAC GCA CAG GAT CTG TAT GCG GCA GGC GAG AAG ATT CGT GGG

ACT GAT GAG ATG AAA TTC ATC ACC ATC CTG TGC ACG CGC AGT GCC

35

ACT CAC CTG CTG AGA GTG TTT GAA GAG TAT GAG AAA ATT GCC AAC

AAG AGC ATT GAG GAC AGC ATC AAG AGT GAG ACC CAT GGC TCA CTG

40

GAG GAG GCC ATG CTC ACT GTG GTG AAA TGC ACC CAA AAC CTC CAC

45

AGC TAC TTT GCA GAG AGA CTC TAC TAT GCC ATG AAG GGA GCA GGG

ACG CGT GAT GGG ACC CTG ATA AGA AAC ATC GTT TCA AGG AGC GAG

50

55

ATT GAC TTA AAT CTT ATC AAA TGT CAC TTC AAG AAG ATG TAC GGC

5 AAG ACC CTC AGC AGC ATG ATC ATG GAA GAC ACC AGC GGC GAC TAC

AAG AAC GCC CTG CTG AGC CTG GTG GGC AGC GAC CCC TGA

10 entspricht, wobei gegebenenfalls vor dem ersten GAT ein Initiationscodon steht und degenerierte Formen dieser DNA.

8. DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in den Abschnitt, der für die Linker-Sequenz zwischen der zweiten und dritten Repeat-Struktur kodiert, ein Oligonukleotid eingefügt wird, das für eine Erkennungssequenz einer spezifischen Protease kodiert.

15 9. DNA nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das für Arginin + 161 (VAC- $\alpha$ ) bzw. + 167 (VAC- $\beta$ ) kodierende Triplet ersetzt wird durch ein Codon, das für eine Aminosäure kodiert, die nicht von Trypsin als bevorzugte Spaltstelle erkannt wird, beispielsweise für Histidin.

10. DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die für Lysin und/oder Arginin kodierenden Triplets gezielt ersetzt werden durch Triplets, die für Histidin kodieren.

20 11. DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und 5 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das oder gegebenenfalls die für Cystein kodierenden Triplets ersetzt wird/werden durch für Serin oder Valin kodierende Triplets.

12. DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Polypeptid/Protein mit Repeat-Bereichen kodiert.

25 13. DNA nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine der Repeat-Bereiche kodiert.

14. DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die für die vollständigen Repeats kodierenden Bereiche umgeordnet sind.

15. DNA nach einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, daß die für die 17 Aminosäuren der konservierten Region kodierenden Bereiche modifiziert sind.

30 16. DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die für die 17 Aminosäuren der konservierten Region kodierenden Bereiche vollständig oder teilweise ersetzt werden

a. bei den VAC-Proteinen durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren bei den Lipocortinen kodieren,

35 b. bei VAC-alfa durch Bereiche die die entsprechenden Aminosäuren des VAC-beta kodieren und umgekehrt,

c. bei Lipocortin I durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren des Lipocortins II kodieren und umgekehrt,

d. bei den Lipocortinen durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren bei den VAC-Proteinen kodieren oder

40 e. bei den übrigen Polypeptiden/Proteinen durch Bereiche, die die entsprechenden Aminosäuren der jeweils anderen Polypeptide/Proteine kodieren.

17. DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Bereiche, die für das N-terminale Peptid kodieren ausgetauscht werden durch Oligonukleotide, die für das N-terminale Peptid eines der anderen, eine Repeat-Struktur aufweisenden Proteine kodiert.

45 18. DNA nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß dem N-terminalen 5'-Ende eine für den jeweiligen Wirt homologe Signalsequenz vorangestellt ist.

19. DNA nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Signalsequenz am 3'-Ende eine spezifische Erkennungs-Spaltstelle für eine Protease kodiert.

50 20. DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß dem N-terminalen 5'-Ende eine für einen Fusionsproteinanteil kodierende Sequenz vorangestellt ist.

21. DNA nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die für den Fusionsproteinanteil kodierende DNA am 3'-Ende eine spezifische Erkennungs-Spaltstelle für eine Protease kodiert.

22. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Allel zu einer der in der vorhergehenden Ansprüchen beschriebenen DNA darstellt.

55 23. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine degenerative Form einer der in den vorhergehenden Ansprüchen beschriebenen DNA darstellt oder daß sie aus Kombinationen verschiedener vollständiger - oder Teil-Sequenzen einer der vorhergehenden Ansprüche besteht, kodierend für Hybridproteine im wesentlichen mit vascular-antikoagulierenden Eigenschaften.

24. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem der DNA-Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 23 unter Bedingungen hybridisieren, die eine Homologie größer als 85%, vorzugsweise größer als 90% erkennen lassen, wobei die DNA aus natürlichen, synthetischen oder halbsynthetischen Ursprungs sein kann und mit den DNA-Molekülen nach einem der Ansprüche 1 bis 23 durch Mutation, Nukleotid-Substitutionen, Nukleotid- Deletionen, Nukleotid-Insertionen und Nukleotid- Inversionen verwandt sein kann und für ein Polypeptid/ Protein mit im wesentlichen den biologischen Eigenschaften der vascular-antikoagulierenden Proteine kodiert.

25. DNA nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einen Vektor eingefügt ist.

26. DNA nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA nach einem der vorhergehenden Ansprüche in einem Vektor in funktioneller Verbindung mit einer Expressionskontrollsequenz verknüpft ist, in Mikroorganismen und Säugetierzellen replizierbar.

27. DNA nach einem der Ansprüche 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Plasmid ist, replizierbar in Prokaryoten.

28. DNA nach einem der Ansprüche 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Plasmid ist, replizierbar in Eukaryoten.

29. DNA nach einem der Ansprüche 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Säugetierzellen replizierbar ist.

30. Wirtsorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er mit einer DNA nach einem der Ansprüche 25 bis 29 transformiert ist.

31. Wirtsorganismus nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Prokaryot, vorzugsweise E.coli ist.

32. Wirtsorganismus nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Eukaryot ist.

33. Wirtsorganismus nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Säugetierzelllinie ist.

34. Verfahren zur Herstellung von DNA-Molekülen die für Polypeptide/Proteine im wesentlichen mit den Eigenschaften der vascular antikoagulierenden Proteine kodieren, dadurch gekennzeichnet, daß man aus einer genomischen DNA-Bibliothek das für dieses Polypeptid kodierende Gen isoliert oder aus der zu diesem Gen gehörenden mRNA eine komplementäre für dieses Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase herstellt oder daß die für dieses Polypeptid kodierende DNA mit Hilfe chemischer und/oder enzymatischer Verfahren hergestellt wird.

35. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA einer der in den Ansprüchen 1 bis 23 beschriebenen entspricht.

36. Verfahren zur Herstellung einer DNA nach einem der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß man in eine mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnittene Vektor-DNA eine mit entsprechenden Enden versehene DNA einfügt, die für ein Polypeptid im wesentlichen mit den Eigenschaften der vaskularantikoagulierenden Proteine kodiert.

37. Verfahren zur Herstellung einer DNA nach einem der Ansprüche 26 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß man in eine mit Restriktionsendonukleasen geschnittene Vektor-DNA, die Expressionskontrollsequenzen enthält, eine mit entsprechenden Enden versehene DNA, die für eine Polypeptid mit im wesentlichen den Eigenschaften von vaskular-antikoagulierenden Proteinen kodiert, so einfügt, daß die Expressionskontrollsequenzen die eingefügte DNA reguliert.

38. Verfahren zur Herstellung transformierter Wirtsorganismen nach einem der Ansprüche 30 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß man den Wirtsorganismus mit einem der Vektoren nach einem der Ansprüche 25 bis 29 transformiert.

39. Polypeptid, im wesentlichen mit den Eigenschaften der vascular-antikoagulierenden Proteine.

40. Polypeptid nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 23 kodiert wird.

41. Polypeptid nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß es der Formel

1	5	10	15
Met	Ala	Gln	Val
Leu	Arg	Gly	Thr
Val	Thr	Asp	Phe
Pro	Gly	Phe	
5			
	20	25	30
Asp	Glu	Arg	Ala
Asp	Ala	XX	Thr
Leu	Arg	Lys	Ala
Met	Lys	Gly	
10			
	35	40	45
Leu	Gly	Thr	Asp
Glu	Glu	Ser	Ile
Leu	Thr	Leu	Leu
Thr	Ser	Arg	
15			
	50	55	60
Ser	Asn	Ala	Gln
Arg	Gln	Glu	Ile
Ser	Ala	Ala	Phe
Lys	Thr	Leu	
20			
	65	70	75
Phe	Gly	Arg	Asp
Leu	Leu	Asp	Asp
Leu	Lys	Ser	Glu
Leu	Thr	Gly	
25			
	80	85	90
Lys	Phe	Glu	Lys
Leu	Ile	Val	Ala
Leu	Met	Lys	Pro
Ser	Arg	Leu	
30			
	95	100	105
Tyr	Asp	Ala	Tyr
Glu	Leu	Lys	His
Ala	Leu	Lys	Gly
Ala	Gly	Thr	
35			
	110	115	120
Asn	Glu	Lys	Val
Leu	Thr	Glu	Ile
Ile	Ala	Ser	Arg
Thr	Pro	Glu	
40			
	125	130	135
Glu	Leu	Arg	Ala
Ile	Lys	Gln	Val
Tyr	Glu	Glu	Glu
Tyr	Gly	Ser	
45			
	140	145	150
Ser	Leu	Glu	Asp
Asp	Val	Val	Gly
Asp	Thr	Ser	Gly
Tyr	Tyr	Gln	
50			
	155	160	165
Arg	Met	Leu	Val
Val	Leu	Leu	Gln
Ala	Asn	Arg	Asp
Pro	Asp	Ala	
55			

	170	175	180
	Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln Ala Leu Phe		
5	185	190	195
	Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile		
10	200	205	210
	Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val Phe		
15	215	220	225
	Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile		
20	230	235	240
	Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val		
25	245	250	255
	Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr <u>Leu</u>		
30	260	265	270
	Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile		
35	275	280	285
	Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg		
40	290	295	300
	Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile		
45	305	310	315
	Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu		
50	320		
	Cys Gly Glu Asp Asp *		

entspricht, wobei XX für Glu oder Asp steht und gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 316 vorliegen.

42. Polypeptid nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß es der Formel



1	5	10	15
Met	Ala	Trp	Trp
5	Lys	Ala	Trp
	Ile	Glu	Gln
	Glu	Gly	Val
	Thr	Val	
	20	25	30
	Lys	Ser	Ser
	Ser	His	Phe
	Asn	Pro	Asp
	Pro	Asp	Ala
	Glu	Thr	Leu
10	35	40	45
	Tyr	Lys	Ala
	Met	Lys	Gly
	Ile	Gly	Thr
	Asn	Glu	Gln
	Ala	Ile	Ile
15	50	55	60
	Asp	Val	Leu
	Thr	Lys	Arg
	Ser	Asn	Thr
	Gln	Arg	Gln
	Gln	Ile	Ala
20	65	70	75
	Lys	Ser	Phe
	Lys	Ala	Gln
	Phe	Gly	Lys
	Asp	Leu	Thr
	Glu	Thr	Leu
25	80	85	90
	Lys	Ser	Glu
	Leu	Ser	Gly
	Lys	Phe	Glu
	Arg	Leu	Ile
	Val	Ala	Leu
30	95	100	105
	Met	Tyr	Pro
	Pro	Tyr	Arg
	Tyr	Glu	Ala
	Lys	Glu	Leu
	His	Asp	Ala
35	110	115	120
	Met	Lys	Gly
	Leu	Gly	Thr
	Lys	Glu	Gly
	Val	Ile	Ile
	Glu	Ile	Leu
40	125	130	135
	Ala	Ser	Arg
	Thr	Lys	Asn
	Gln	Leu	Arg
	Glu	Ile	Met
	Lys	Ala	Tyr

	140	145	150
	Glu Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Glu Asp Ile Gln Ala Asp		
5	155	160	165
	Thr Ser Gly Tyr Leu Glu Arg Ile Leu Val Cys Leu Leu Gln Gly		
10	170	175	180
	Ser Arg Asp Asp Val Ser Ser Phe Val Asp Pro Ala Leu Ala Leu		
15	185	190	195
	Gln Asp Ala Gln Asp Leu Tyr Ala Ala Gly Glu Lys Ile Arg Gly		
20	200	205	210
	Thr Asp Glu Met Lys Phe Ile Thr Ile Leu Cys Thr Arg Ser Ala		
25	215	220	225
	Thr His Leu Leu Arg Val Phe Glu Glu Tyr Glu Lys Ile Ala Asn		
30	230	235	240
	Lys Ser Ile Glu Asp Ser Ile Lys Ser Glu Thr His Gly Ser Leu		
35	245	250	255
	Glu Glu Ala Met Leu Thr Val Val Lys Cys Thr Gln Asn Leu His		
40	260	265	270
	Ser Tyr Phe Ala Glu Arg Leu Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly		
45	275	280	285
	Thr Arg Asp Gly Thr Leu Ile Arg Asn Ile Val Ser Arg Ser Glu		
50	290	295	300
	Ile Asp Leu Asn Leu Ile Lys Cys His Phe Lys Lys Met Tyr Gly		
55	305	310	315
	Lys Thr Leu Ser Ser Met Ile Met Glu Asp Thr Ser Gly Asp Tyr		

320

325

Lys Asn Ala Leu Leu Ser Leu Val Gly Ser Asp Pro \*

entspricht, wobei gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an den Positionen 161 und/oder 206 und/oder 250 und/oder 293 und/oder Aggregationen durch intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den genannten Positionen vorliegen.

43. Polypeptid nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß es der Formel

1	5	10	15
Met	Ala	Gln	Val
20	25	30	
Asp	Glu	Arg	Ala
35	40	45	
Leu	Gly	Thr	Asp
50	55	60	
Ser	Asn	Ala	Gln
65	70	75	
Phe	Gly	Arg	Asp
80	85	90	
Lys	Phe	Glu	Lys
95	100	105	
Tyr	Asp	Ala	Tyr

110 115 120  
 Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu  
 5  
 125 130 135  
 Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser  
 10  
 140 145 150  
 Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln  
 15  
 155 160  
 Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg

20 entspricht, wobei XX für Glu oder Asp steht und gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen vorliegen.

44. Polypeptid nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß es der Formel

25 5  
 X Asp Pro Asp Ala  
 30 10 15 20  
 Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln Ala Leu Phe  
 35 25 30 35  
 Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile  
 40 40 45 50  
 Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val Phe  
 45 55 60 65  
 Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile  
 50  
 55

	70	75	80
	Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val		
5	85	90	95
	Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu		
10	100	105	110
	Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile		
15	115	120	125
	Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg		
20	130	135	140
	Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile		
25	145	150	155
	Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu		
30	160		
	Cys Gly Glu Asp Asp *		

entspricht, wobei X für Methionin oder Wasserstoff steht und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 156 vorliegen.

35 45. Polypeptid nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß es der Formel

	1	5	10	15
	Met Ala Trp Trp Lys Ala Trp Ile Glu Gln Glu Gly Val Thr Val			
40				
	20	25	30	
	Lys Ser Ser Ser His Phe Asn Pro Asp Pro Asp Ala Glu Thr Leu			
45				
50				
55				

35 40 45  
 Tyr Lys Ala Met Lys Gly Ile Gly Thr Asn Glu Gln Ala Ile Ile  
 5  
 50 55 60  
 Asp Val Leu Thr Lys Arg Ser Asn Thr Gln Arg Gln Gln Ile Ala  
 10  
 65 70 75  
 Lys Ser Phe Lys Ala Gln Phe Gly Lys Asp Leu Thr Glu Thr Leu  
 15  
 80 85 90  
 Lys Ser Glu Leu Ser Gly Lys Phe Glu Arg Leu Ile Val Ala Leu  
 20  
 95 100 105  
 Met Tyr Pro Pro Tyr Arg Tyr Glu Ala Lys Glu Leu His Asp Ala  
 25  
 110 115 120  
 Met Lys Gly Leu Gly Thr Lys Glu Gly Val Ile Ile Glu Ile Leu  
 30  
 125 130 135  
 Ala Ser Arg Thr Lys Asn Gln Leu Arg Glu Ile Met Lys Ala Tyr  
 35  
 140 145 150  
 Glu Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Glu Asp Ile Gln Ala Asp  
 40  
 155 160 165  
 Thr Ser Gly Tyr Leu Glu Arg Ile Leu Val Cys Leu Leu Gln Gly  
 45  
 Ser Arg

entspricht, wobei gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 161 vorliegen.

46. Polypeptid nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß es der Formel

	5	10
	X Asp Asp Val Ser Ser Phe Val Asp Pro Ala Leu Ala Leu	
5	15	20
	Gln Asp Ala Gln Asp Leu Tyr Ala Ala Gly Glu Lys Ile Arg Gly	
10	30	40
	Thr Asp Glu Met Lys Phe Ile Thr Ile Leu Cys Thr Arg Ser Ala	
15	45	55
	Thr His Leu Leu Arg Val Phe Glu Glu Tyr Glu Lys Ile Ala Asn	
20	60	70
	Lys Ser Ile Glu Asp Ser Ile Lys Ser Glu Thr His Gly Ser Leu	
25	75	85
	Glu Glu Ala Met Leu Thr Val Val Lys Cys Thr Gln Asn Leu His	
30	90	100
	Ser Tyr Phe Ala Glu Arg Leu Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly	
35	105	115
	Thr Arg Asp Gly Thr Leu Ile Arg Asn Ile Val Ser Arg Ser Glu	
40	120	130
	Ile Asp Leu Asn Leu Ile Lys Cys His Phe Lys Lys Met Tyr Gly	
45	135	145
	Lys Thr Leu Ser Ser Met Ile Met Glu Asp Thr Ser Gly Asp Tyr	
50	150	160
	Lys Asn Ala Leu Leu Ser Leu Val Gly Ser Asp Pro *	

entspricht, wobei X für Methionin oder Wasserstoff steht und/oder wobei gegebenenfalls intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an den Positionen 40 und/oder 84 und/oder 127 und/oder Aggregationen durch intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den genannten Positionen vorliegen.

55 47. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, völlig frei von homologen Polypeptiden.

48. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Leader-Peptid enthält.

49. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

a. daß es einen Fusionsproteinanteil enthält und/oder  
 b. daß es aus Teilbereichen der Polypeptide nach einem der vorhergehenden Ansprüche besteht (Hybridproteine) und/oder

c. daß es als Dimeres, Trimeres, Tetrameres oder Multimeres vorliegt.

5 50. Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden im wesentlichen mit den Eigenschaften der vascular-antikoagulierenden Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß

a. ein geeigneter Wirtsorganismus mit genetischen Informationen, kodierend für ein VAC-Protein transformiert,

b. die Information zur Produktion des VAC-Proteins im Wirtsorganismus exprimiert und

10 c. das VAC-Protein isoliert wird.

51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurchs gekennzeichnet, daß der Wirtsorganismus gemäß den Ansprüchen 30 bis 33 definiert ist.

52. Verfahren nach Anspruch 50 oder 51, dadurch gekennzeichnet, daß die genetischen Informationen in den DNA-Molekülen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 29 enthalten sind.

15 53. Verfahren nach einem der Ansprüche 50 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß das VAC-Protein gemäß einem der Ansprüche 39 bis 49 definiert ist.

54. Polypeptid herstellbar nach einem der Ansprüche 50 bis 53.

55. Pharmazeutisch tolerierbare Salze der Polypeptide nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54.

56. Verwendung der Polypeptide nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 zur therapeutischen oder prophylaktischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

57. Verwendung der Polypeptide nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 zur Herstellung pharmazeutischer Präparate.

58. Verwendung der Polypeptide nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 als blutgerinnungshemmende Mittel.

25 59. Verwendung der Polypeptide nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 als antiinflammatorische Mittel.

60. Verwendung der Polypeptide nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 als antirheumatisches Mittel.

61. Verwendung der Polypeptide nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 in den für die Lipocortine geltenden Indikationen.

30 62. Verwendung der Polypeptide/Proteine, die Repeat-Bereiche aufweisen als blutgerinnungshemmende Mittel.

63. Verwendung der Polypeptide/Proteine, die Repeat-Bereiche aufweisen als Thrombin-inhibierendes Mittel.

35 64. Verwendung der Polypeptide/Proteine, die Repeat-Bereiche aufweisen als antiinflammatorische Mittel.

65. Verwendung der Polypeptide/Proteine, die Repeat-Bereiche aufweisen als antirheumatisches Mittel.

66. Verwendung der Lipocortine als blutgerinnungshemmende Mittel.

67. Verwendung der Lipocortine als Thrombin-inhibierende Mittel.

40 68. Verwendung der Lipocortine in den für die Proteine nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 geltenden Indikationen.

69. Verwendung der Polypeptide nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 als Thrombin-inhibierende Mittel.

70. Mittel zur therapeutischen Behandlung, dadurch gekennzeichnet, daß es neben pharmazeutisch 45 inerten Trägerstoffen eine wirksame Menge eines Polypeptides nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 enthält.

71. Hybrid-Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß sie monoklonale Antikörper gegen eines der Polypeptide nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 sezerniert.

72. Monoklonale Antikörper dadurch gekennzeichnet, daß sie spezifisch die Wirkung der Polypeptide 50 nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 ganz oder teilweise neutralisieren oder spezifisch an eines der besagten Polypeptide binden.

73. Verwendung der monoklonalen Antikörper nach Anspruch 73 zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung eines der Polypeptide nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54

74. Verwendung der monoklonalen Antikörper nach Anspruch 73 zur Reinigung eines der Polypeptide 55 nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54

75. Test Kit zur Bestimmung von Polypeptiden nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonale Antikörper nach Anspruch 73 enthält.



76. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern nach Anspruch 73 dadurch gekennzeichnet, daß Wirtstiere mit einem der Polypeptide nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 immunisiert, B-Lymphozyten dieser Wirtstiere mit Myelomzellen fusioniert, die die monoklonalen Antikörper ausscheidenden Hybrid-Zelllinien subkloniert und in vitro oder in vivo kultiviert werden.

5 77. Pharmazeutisch tolerierbare Addukte und kovalente Verbindungen zwischen den Polypeptiden nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 mit einem inerten Träger, zur therapeutischen oder prophylaktischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

78. Pharmazeutisch tolerierbare Addukte oder kovalente Verbindungen zwischen den Polypeptiden nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 mit zum Beispiel Polyethylenglykol, zur therapeutischen oder prophylaktischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

10 79. Verwendung der Polypeptide nach einem der Ansprüche 39 bis 49 oder 54 als blutkonservierende Mittel.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

## Tryptic peptides

P5           H A L K  
 P7           G E T S G D Y K  
 P11/I       W G T D E E K  
 P11/II      T P E E L R  
 P12         G A G T D D H T L I R  
 P14         Q E I S A A F K  
 P15         T L F G R  
 P16/I       L Y D A Y E L K  
 P16/II      W? L Y D A Y E L K  
 P17         V L T E I I A S R  
 P18         G T V T D F P G F D E R  
 P20/I       Q V Y E E E Y G S S L E D D V V G D T S  
             G Y Y Q R  
 P20/II      L I V A L M K  
 P21/I       S E I D L F N I R K  
 P23/I       F I T I F G T R  
 P24         K N F A T S L Y S M I K  
 P25         S? G T D E E K F I T I F G T  
 P27         D L L D D L K S E L T G K F E K  
 P29/I       G L G T D E E S I L T L L T S R  
 P29/II      M L V V L L Q A N R D P D A G I D E A Q  
             V X Q X A Q A L F Q A  
 P30/I       X I P A Y L A E T L Y Y A M K  
 P30/II      E T X G N L E Q L L L A V V K

## BrCN-Peptides

BrCN 1      K G A G T D D H T L I R V  
 BrCN 4      I K G D T S G D Y K K A  
 BrCN 15     K P S R L Y D A Y E L K H A L K G A G T  
             N E K V L T E I I  
 BrCN 22     K G L G T D E E S I L T L L T S X X N A  
             Q

FIG.01

FIG. 0.2

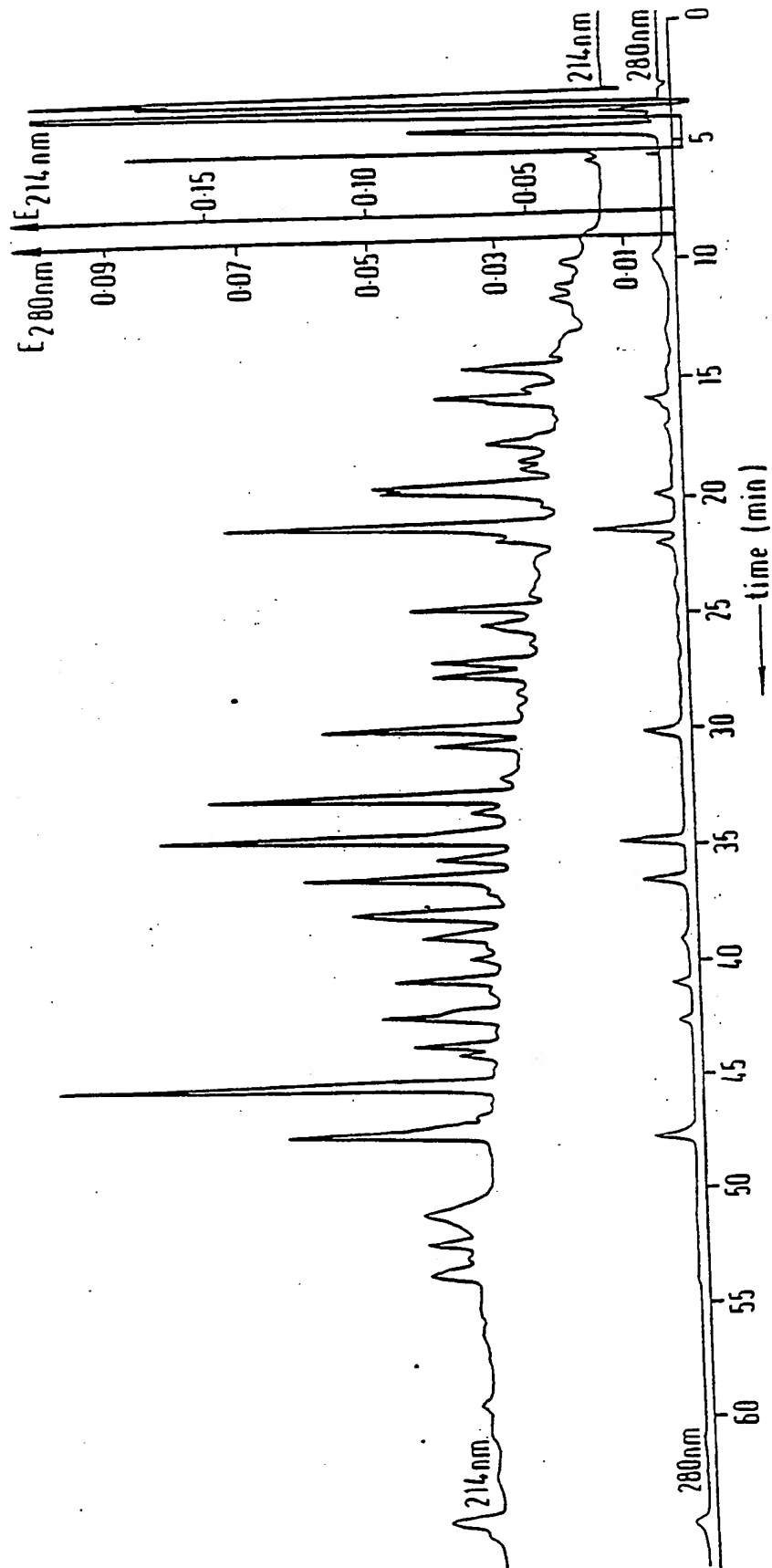
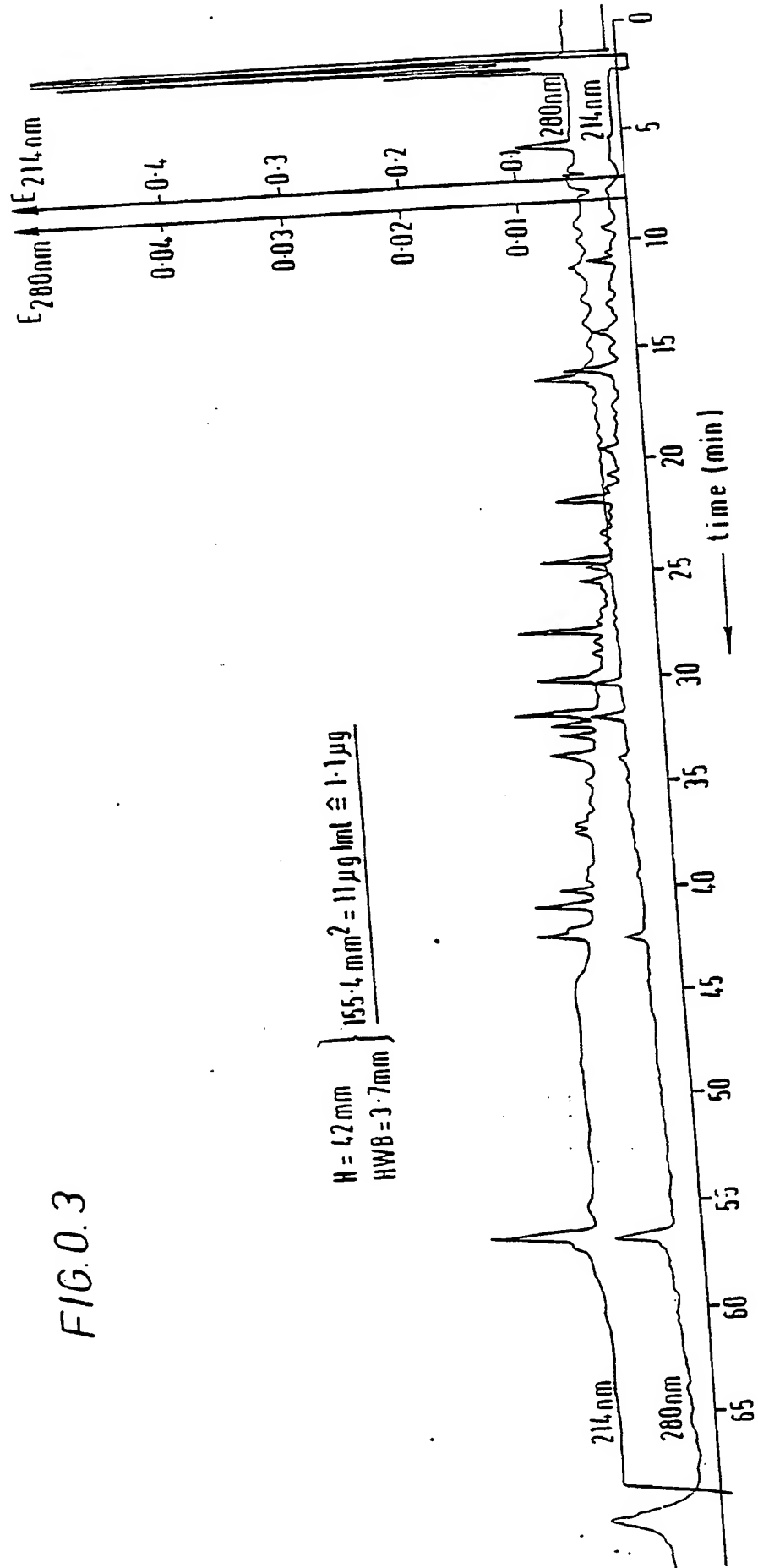


FIG. 0.3



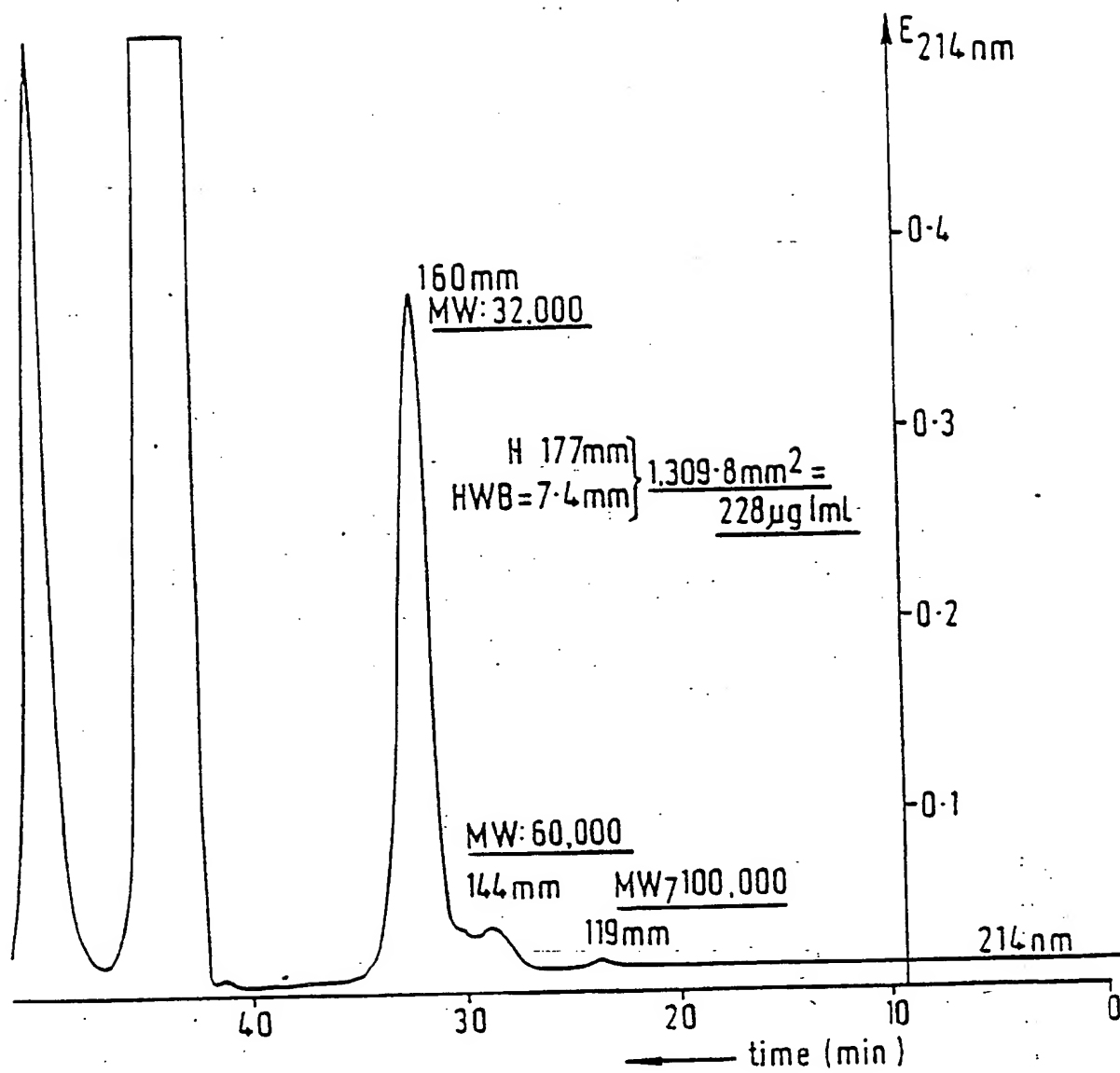


FIG. 0.4/1

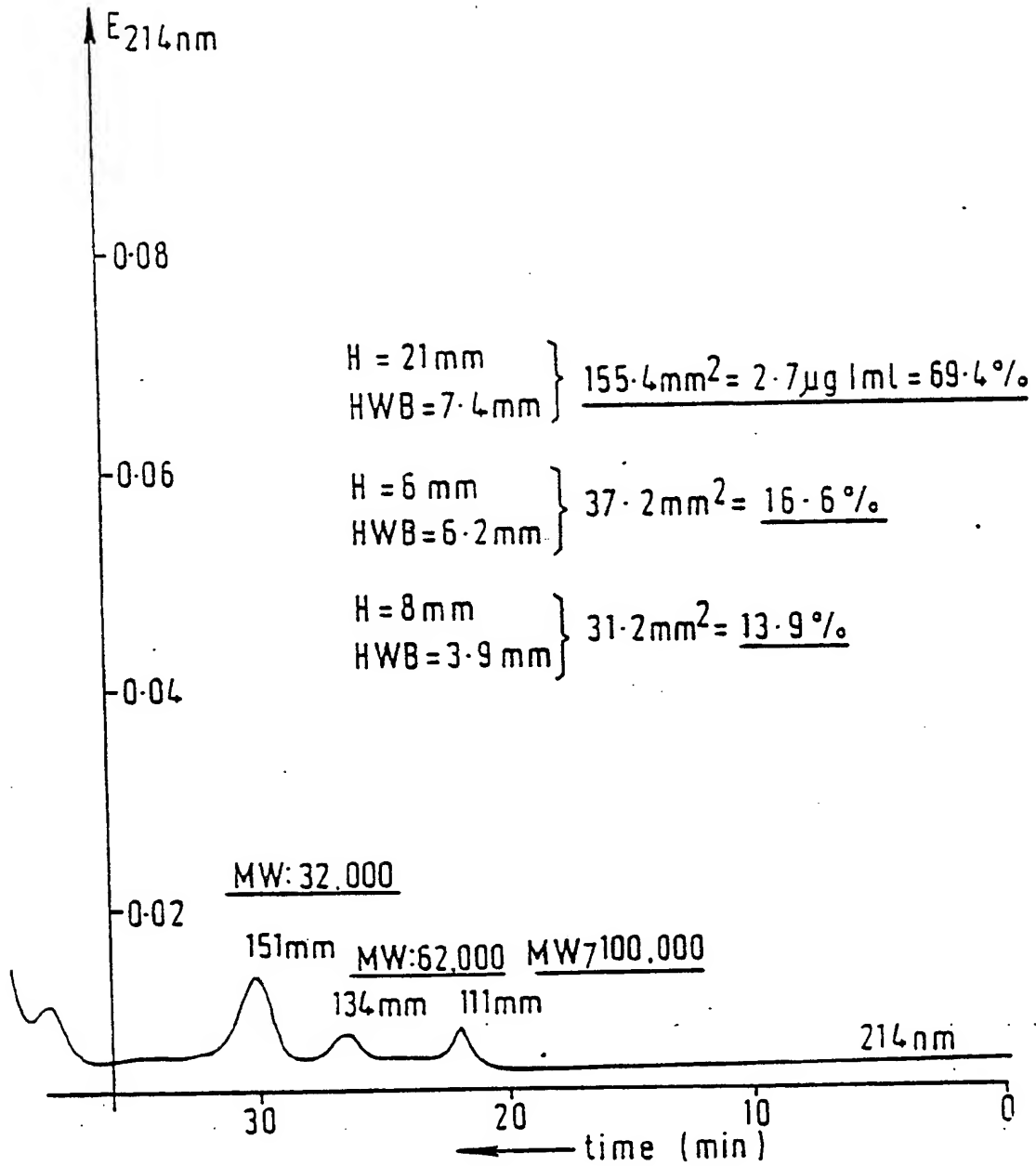


FIG. 0. 4/2

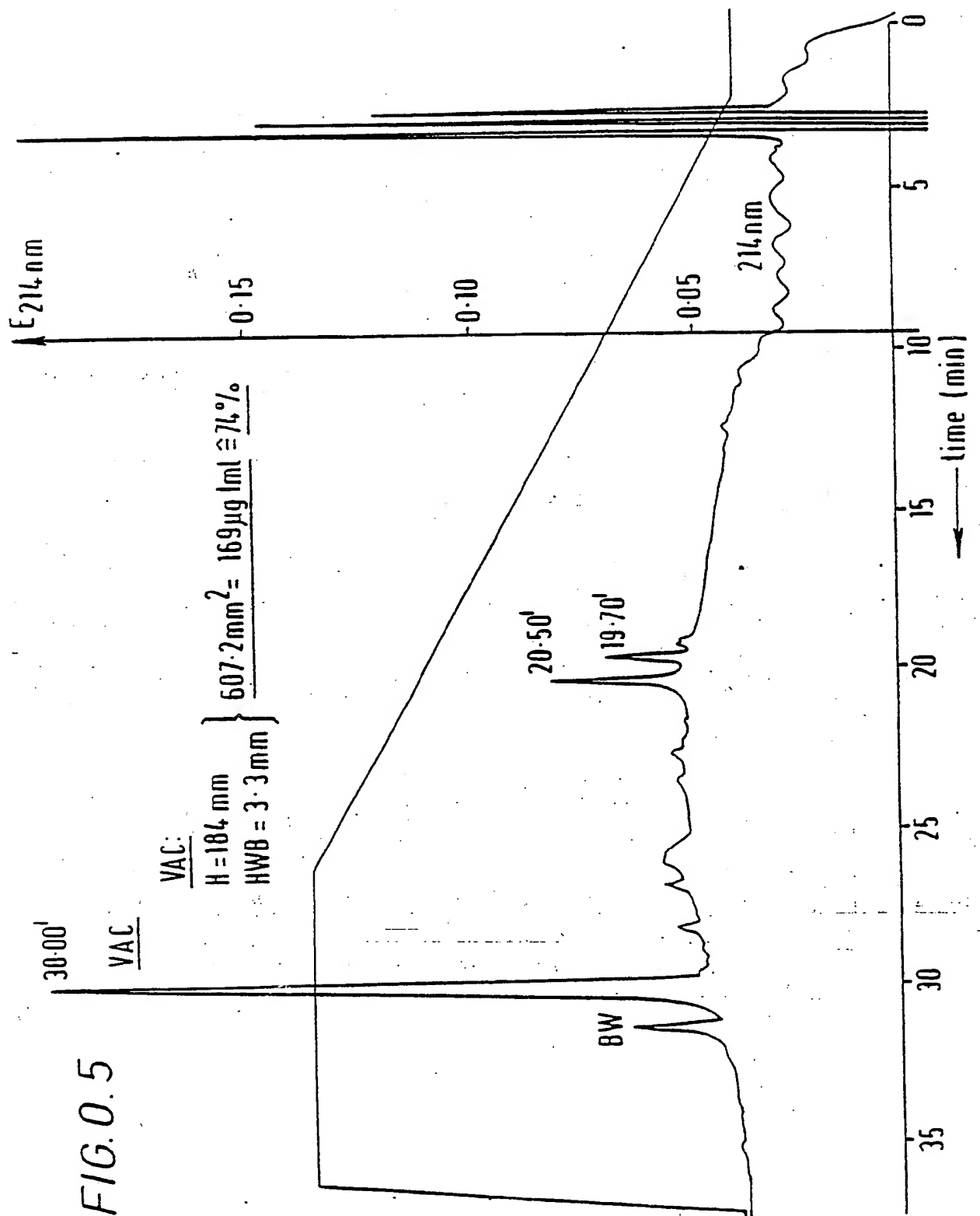
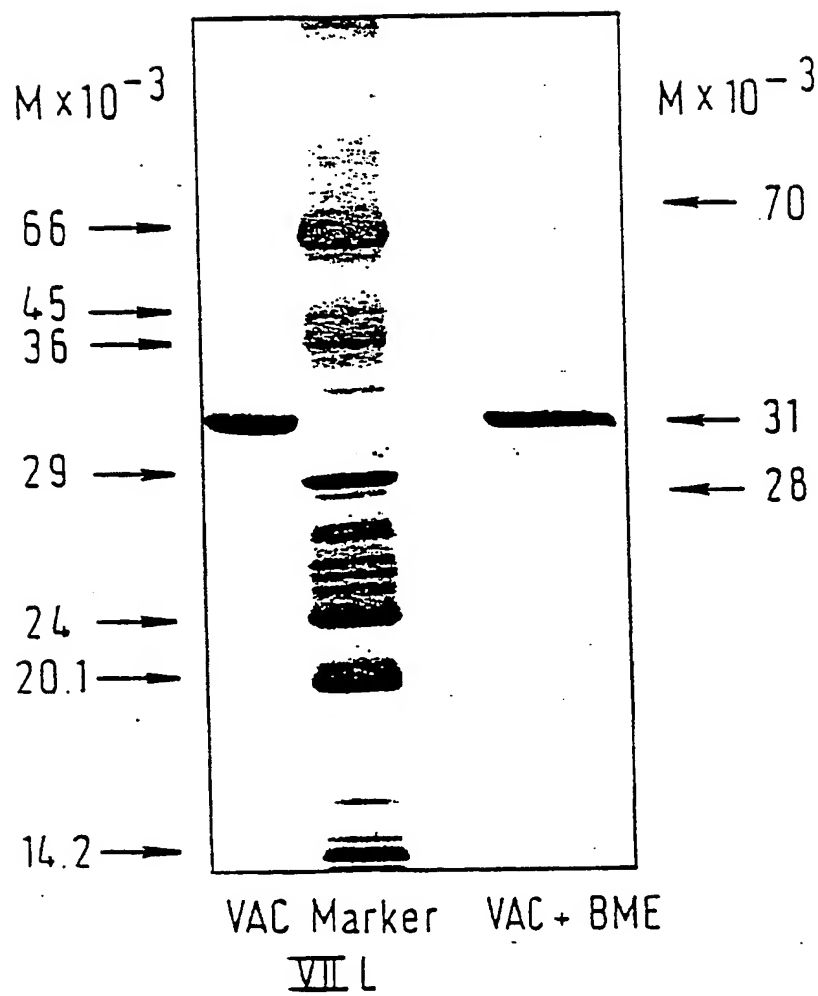


FIG. 0.6





## Tryptic peptide P16/II

W? L Y D A Y E L K  
 5' ...UGGCUNUAUGAUGCNUAUGAA... 3' mRNA  
           C C C G  
       UUA  
       G

3' ACCGAAATACTACGAATACT 5' EBI - 387  
       G G G G G  
       C C  
       T T

3' ACCAACATACTACGAATACT 5' EBI - 388  
       T G G G G  
           C  
       T

Staph-A Peptide P20/I/6  
 (Subfragment of the tryptic peptide P20/I)

D D V V G D T S G Y Y R  
 5' ...GAUGAUGUNGUNGNGAUACN... 3' mRNA  
       C C C

3' CTACTACAACAACCACTATG 5' EBI - 386  
       G G G G G G  
       C C C  
       T T T

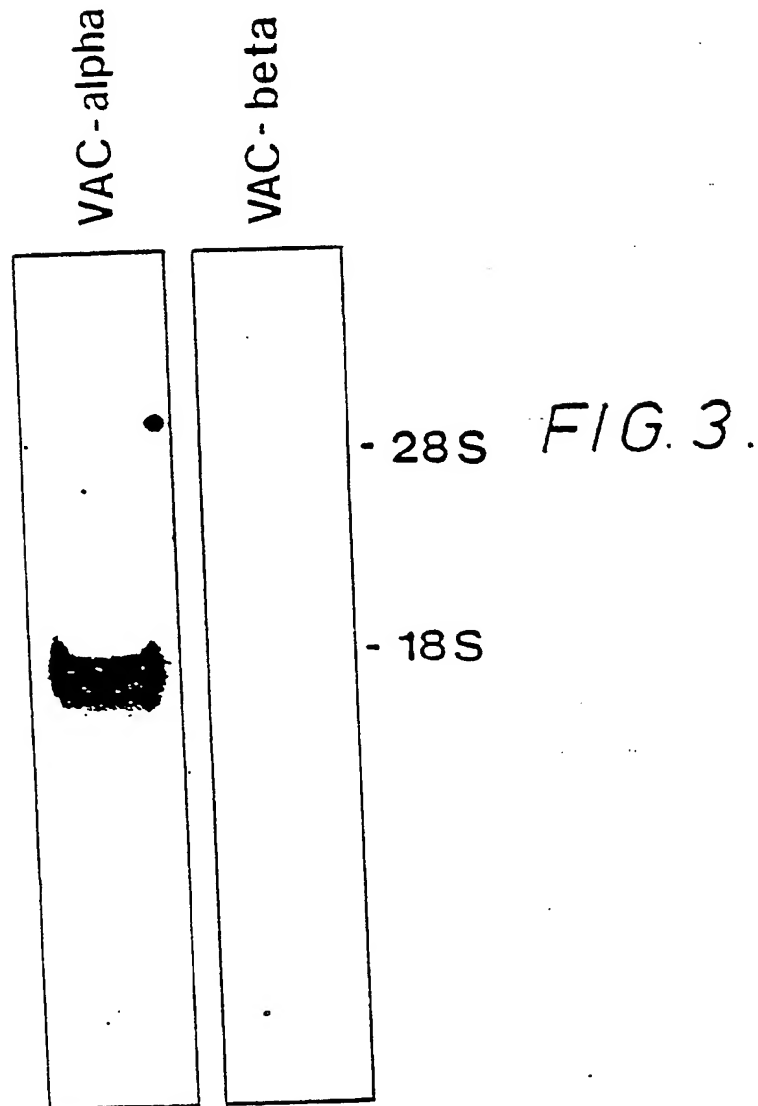
FIG. 1.

FIG. 2.

Tryptic peptide P30/I

X I P A Y L A E T L Y Y A M K  
 5' ...GAAACNCUNUACUACGCNAUGAAA... 3' mRNA  
           G          U U          G  
           UUA  
           G

3' CTCTGIIAIAIATATCGITACTT 5' EBI - 118  
 3' CTTTGGIIAIAIATATCGITACTT 5' EBI - 119





Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Ala	155	160	165
CGG ATG TTG GTG GTT CTC CTT CAG GCT AAC AGA GAC CCT GAT GCT			495
Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln Ala Leu Phe	170	175	180
GGA ATT GAT GAA GCT CAA GTT GAA CAA GAT GCT CAG GCT TTA TTT			540
Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile	185	190	195
CAG GCT GGA GAA CTT AAA TGG GGG ACA GAT GAA GAA AAG TTT ATC			585
Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val Phe	200	205	210
ACC ATC TTT GGA ACA CGA AGT GTG TCT CAT TTG AGA AAG GTG TTT			630
Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile	215	220	225
GAC AAG TAC ATG ACT ATA TCA GGA TTT CAA ATT GAG GAA ACC ATT			675
Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val	230	235	240
GAC CGC GAG ACT TCT GGC AAT TTA GAG CAA CTA CTC CTT GCT GTT			720
Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu	245	250	255
GTG AAA TCT ATT CGA AGT ATA CCT GCC TAC CTT GCA GAG ACC CTC			765
Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile	260	265	270
TAT TAT GCT ATG AAG GGA GCT GGG ACA GAT GAT CAT ACC CTC ATC			810
Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg	275	280	285
AGA GTC ATG GTT TCC AGG AGT GAG ATT GAT CTG TTT AAC ATC AGG			855
Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile	290	295	300
AAG GAG TTT AGG AAG AAT TTT GCC ACC TCT CTT TAT TCC ATG ATT			900
Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu	305	310	315
AAG GGA GAT ACA TCT GGG GAC TAT AAG AAA GCT CTT CTG CTG CTC			945
Cys Gly Glu Asp Asp *	320		
TGT GGA GAA GAT GAC TAA CGTGTCACGGGGAAGAGCTCCCTGCTGTGTGCCTG			998

FIG. 4/2

CACCACCCCACTGCCTTCCTTCAGCACCTTTAGCTGCATTGTGTATGCCAGTGCTTAACA 1057  
CATTGCCTTATTCATACTAGCATGCTCATGACCAACACATACACGTCATAGAAGAAAAAT 1116  
AGTGGTGCTTCTTTCTGATCTCTAGTGGAGATCTCTTTGACTGCTGTAGTACTAAAGTG 1175  
TACTTAATGTTACTAAGTTTAATGCCTGGCCATTTCCATTTATATATATTTTTTTAAGA 1234  
GGCTAGAGTGCTTTTAGCCTTTTTTAAAACTCCATTTATATTACATTTGTAACCATGA 1293  
TACTTTAATCAGAAGCTTAGCCTTGAAATTGTGAACTCTTGAAATGTTATTAGTGAAG 1352  
TTCGCAACTAACTAAACCTGTAAAATTATGATGATTGTATTCAAAGATTAATGAAAA 1411  
ATAAACATTTCTGTCCCCCTG-polyA 1437

FIG. 4/3



P30/II  
 E T X G N L E Q L L L A V V K  
 R E T S G N L E Q L L L A V V K S I R S I P A Y L A E T L Y Y A  
 230 240 250

BrCN 1  
 K G A G T D D H T L I R V  
 P12  
 M K G A G T D D H T L I R  
 M K G A G T D D H T L I R V M V S R S E I D L F N I R K E F R K  
 260 270 280 290

BrCN 4  
 I K G D T S G D Y K K A  
 P7  
 N F A T S L Y S M I K G E T S G D Y K  
 N F A T S L Y S M I K G D T S G D Y K K A L L L L C G E D D \*  
 300 310 320

FIG. 5/2

## FIG. 6.

VAC-alpha: Quadruplication of a.67 amino acid long sequence

MAQVLRGTVTDPPGFDERA

DAETLRKAMKG-LGTDEESILTLTSRSNAQRQEISAAFKTLFGDLDLKLKSELTKGFEKLIVALMK PSRLY

DAYELKHALKG-AGTNEKVLTEIIASRTPEELRAIKQVYEEYEGSSLEDDVVGDTSGYQRHMLVLLQ ANRDPDAGIDEAQVI

DAQALFQAGELKWGTDEEKFITIFGTRSVSHLRKVFDKYMTISGFQIETIDRETSGHLEQLLAVVK SIRSIPAY

LAETIYYAMKG-AGTDDHTLIRVMVSRSEIDLFNIRKEFRKNFATSLYSMIKGDTSGDYKKALLLIGG EDD\*

KG-hGTDExxLlplApR

000000

DAETL AmKG aGTDEe llll SRS Lr I y t FG sLeddIkgetSG yekllval. k  
d

"Consensus":

x : 50% of amino acids identical  
X : 75% of amino acids identical  
X : 100% of amino acids identical

"000000" :

Hydrophobic region



## VAC-beta cDNA

AGGCCTGCTCACTCCTCAGCTGCAGGAGCCAGACGTGTGGAGTCCCA  
 GCAGAGGCCAACCTGTGTCTCTTCATCTCCGTGAGAAAGGTGCCCCGAAGTGAAAGAG

1	5	10	15	
Met	Ala	Trp	Trp	Lys
Ala	Trp	Lys	Ala	Trp
Trp	Ile	Glu	Gln	Glu
Gly	Val	Thr	Val	
ATG	GCC	TGG	TGG	AAA
GCC	TGG	ATT	GAA	CAG
GAG	GGT	GTC	ACA	GTG
				45
20	25	30		
Lys	Ser	Ser	Ser	His
Phe	Asn	Pro	Asp	Pro
Asp	Ala	Glu	Thr	Leu
AAG	AGC	AGC	TCC	CAC
TTC	AAC	CCA	GAC	CCT
GAT	GCA	GAG	ACC	CTC
				90
35	40	45		
Tyr	Lys	Ala	Met	Lys
Gly	Ile	Gly	Thr	Asn
Glu	Gln	Ala	Ile	Ile
TAC	AAA	GCC	ATG	AAG
GGG	ATC	GGG	ACC	AAC
GAG	CAG	GCT	ATC	ATC
				135
50	55	60		
Asp	Val	Leu	Thr	Lys
Arg	Ser	Asn	Thr	Gln
Arg	Gln	Gln	Ile	Ala
GAT	GTG	CTC	ACC	AAG
AGA	AGC	AAC	ACG	CAG
CGG	CAG	CAG	ATC	GCC
				180
65	70	75		
Lys	Ser	Phe	Lys	Ala
Gln	Phe	Gly	Lys	Asp
Leu	Thr	Glu	Thr	Leu
AAG	TCC	TTC	AAG	GCT
CAG	TTC	GGC	AAG	GAC
CTC	ACT	GAG	ACC	TTG
				225
80	85	90		
Lys	Ser	Glu	Leu	Ser
Gly	Lys	Phe	Glu	Arg
Leu	Ile	Val	Ala	Leu
AAG	TCT	GAG	CTC	AGT
GGC	AAG	TTT	GAG	AGG
CTC	ATT	GTG	GCC	CTT
				270
95	100	105		
Met	Tyr	Pro	Pro	Tyr
Arg	Tyr	Glu	Ala	Lys
Glu	Leu	His	Asp	Ala
ATG	TAT	CCG	CCA	TAC
AGA	TAC	GAA	GCC	AAG
GAG	CTG	CAT	GAC	GCC
				315
110	115	120		
Met	Lys	Gly	Leu	Gly
Thr	Lys	Glu	Gly	Val
Ile	Ile	Glu	Ile	Leu
ATG	AAG	GGC	TTA	GGA
ACC	AAG	GAG	GGT	GTC
ATC	ATT	GAG	ATC	CTG
				360
125	130	135		
Ala	Ser	Arg	Thr	Lys
Asn	Gln	Leu	Arg	Glu
Ile	Met	Lys	Ala	Tyr
GCC	TCT	CGG	ACC	AAG
AAC	CAG	CTG	CGG	GAG
ATA	ATG	AAG	GCG	TAT
				405
140	145	150		
Glu	Glu	Asp	Tyr	Gly
Ser	Ser	Leu	Glu	Glu
Asp	Ile	Gln	Ala	Asp
GAG	GAA	GAC	TAT	GGG
TCC	AGC	CTG	GAG	GAG
GAC	ATC	CAA	GCA	GAC
				450

FIG. 7/1

FIG. 7/2

AAGAACAAGAGCAAAGACCATGAAGCCAGAGTCTCCAGGACTCCTCACTCAACCTCGGC 1050  
CATGGACGCAGGTTGGGTGTGAGGGGGGTCCCAGCCTTTCGGTCTTCTATTTCCCTATT 1109  
TCCAGTGCTTTCCAGCCGGGTTTCTGACCCAGAGGTGGAACCGGCCTGGACTCCTCTTC 1168  
CCAACTTCCTCCAGGTCATTTCCTCAGTGTGAGCACAATGCCAACCTTAGTGTTTCTCCA 1227  
GCCAGACAGATGCCTCAGCATGAAGGGCTTGGGGACTTGTGGATCATTCCCTTCCTCCCT 1286  
GCAGGAGCTTCCCAAGCTGGTCACAGAGTCTCCTGGGCACAGGTTATACAGACCCCAGC 1345  
CCCATTCCTCATCTACTGAAACAGGGTCTCCACAAGAGGGGCCAGGGAATAATGGGTTTTT 1404  
AACAAAGCGTCTTACAAAACACTTCTCTATCATGCAGCCGGAGAGCTGGCTGGGAGCCCT 1463  
TTTGTTTTAGAACACACATCCTTCAGCAGCTGAGAAATGAACACGAATCCATCCCAACC 1522  
GAGATGCCATTAAACATTCATCTAAAAATGTTAGGCTCTAAATGGACGAAAAATCTCTC 1581  
GCCATCTTAATAACAAAATAAACTACAAATTCCTGACCCAAGGACACTGTGTTATAAGA 1640  
GGCGTGGGCTCCCCTGGTGGCTGACCAGGTCAGCTGCCCTGGCCTTGCACCCCCTCTGCA 1699  
TGCAGCACAGAAGGGTGTGACCATGCCCTCAGCACCCTCTTGTCCCCACTGAACGGCA 1758  
ACTGAGACTGGGTACCTGGAGATTCTGAAGTGCCTTTGCTGTGGTTTTCAAAATAATAA 1817  
AGATTTGTATTCAACTC-polyA 1834

FIG. 7/3

# FIG. 8

VAC-beta: Quadruplication of a 67 amino acid long sequence

MAWAKAVIEQEGVTVKSSSIHNPDP	
DAETLYKAMKG-IGTNEQAIJDVLTKRSNTORQQIAKSFKAQFGKDLTETLKSELGKFERLIVALMY	PPYRY
EAKELHDAMKG-LGTKEGVIIEILASRTKNQLREIMKAYEEDYCGSSLEEDIQADTSGYLERILVCLLQ	GSRDDVSSFVDPALAIQ
DAQDLYAAGEKIRGTDENKFTITLCTRSATHLLRVFEEYEKIANKSIEDSIKSETHGSLFEAMLTVVK	CTQNLHSY
FAERIYYAMKG-AGTRDGTILRNIVSRSEIDILNLKCHFKKMYCKTLSSMIMEDTSGDYKNALISLVG	SDP*

KG-hGTDExxl.lpIlApr

dāē LY āMKG GT Eg 11 1L sRS tql. I k ykk yGkslee lksetSG lEralv Lvk  
fe d l

"Consensus": x : 50% of amino acids identical  
X : 75% of amino acids identical  
X̄ : 100% of amino acids identical

"000000" : Hydrophobic region

# Amino acid composition

---

	VAC-alpha		VAC-beta	
Ala	26	( 8,1%)	25	( 7,7%)
Cys	1	( 0,3%)	4	( 1,2%)
Asp	25	( 7,8%)	20	( 6,1%)
Asn	6	( 1,9%)	9	( 2,8%)
Glu	29	( 9,1%)	29	( 8,9%)
Gln	12	( 3,8%)	12	( 3,7%)
Phe	13	( 4,1%)	9	( 2,8%)
Gly	22	( 6,9%)	20	( 6,1%)
His	3	( 0,9%)	6	( 1,8%)
Ile	18	( 5,6%)	23	( 7,0%)
Lys	22	( 6,9%)	27	( 8,3%)
Leu	38	(11,9%)	33	(10,1%)
Met	8	( 2,5%)	11	( 3,4%)
Pro	5	( 1,6%)	6	( 1,8%)
Arg	19	( 5,9%)	15	( 4,6%)
Ser	21	( 6,6%)	27	( 8,3%)
Thr	23	( 7,2%)	21	( 6,4%)
Val	16	( 5,0%)	13	( 4,0%)
Trp	1	( 0,3%)	3	( 0,9%)
Tyr	12	( 3,8%)	14	( 4,3%)

MW = 35896

MW = 36837

charged:

98 (30,6%)

97 (29,6%)

## FIG. 9.

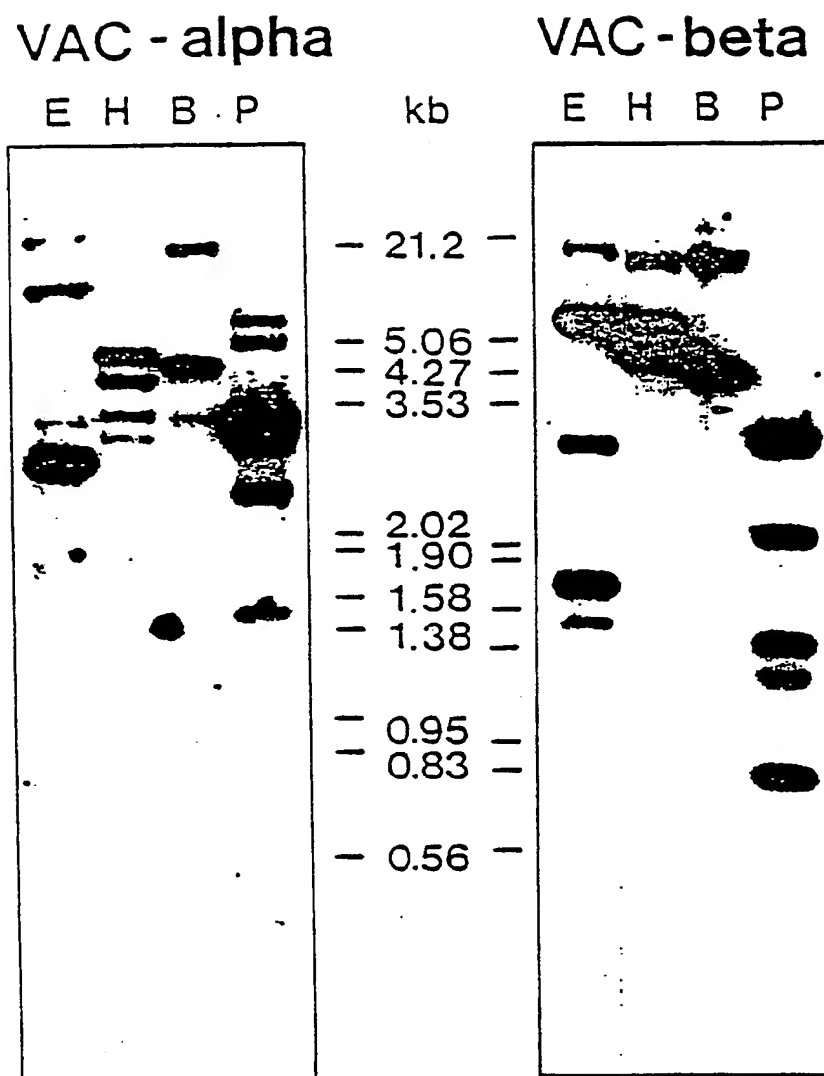


FIG. 10.

## FIG. 11.

## Comparison of VAC-alpha and VAC-beta

alpha  
beta

MAQVLRGTVTDFPGFDERA  
MAWAKAVIEQEGV...KSSSH.NPDP

alpha DAETLRKAMKGLGTDEESILTLTSSNAQRQEISAAFKTLFGDDLLDDLKSELTGKFEKLIVALKM PSRLY  
beta .....Y.....I..N.QA.IDV..K...T...Q.AKS..AQ..K..TET.....S.....R.....Y .PYR.

alpha DAYELKHALKGAGTNEKVLTEIIASRTPEELRAIKQVYEEYCGSSLEDDVVGDTSYQYQRMVLVLQ ANRDPDAG-IDEAQVEQ  
beta E.K..HD;M..L..K.G.II..L.....KNQ..E.MKA...D.....E.IQA.....LE.I..C.... GS...DVSSFV.P.LAL.

alpha DAQALFQAGELKWGTDEEKFITIFGTRSVSHLRKVFDKYMTISGFQIEETIDRETSGNLEQLLAVVK SIRSIPAY  
beta ...D.YA...KIR.....M.....LC....AT..LR..EE.EK.ANKS..DS.KS..H.S..EAM.T... CTQNLHS.

alpha LAETLYYAMKGAGTDDHTLIRVMVSRSEIDLFNIRKEFRKNFATSLYSMIKGDTSQDYKKALLLCG EDD\*  
beta F..R.....R.G....NI.....NL.KCH.K.MYGKT.S...ME.....N...S.V. S.P\*

## Comparison of VAC-alpha and beta cDNA

VA	ATGGCACAGGTTCTCAGAGGCACTGTGACTGACTTCCCTGGA	42
VB	ATGGCCTGGTGGAAAGCCTG.ATTG.ACAGGAGG.T.T...A....AGAG.AG.T.CCAC	60
VA	TTTGATGAGCGGGCTGATGCAGAACTCTTCGGAAGGCTATGAAAGGCTTGGGCACAGAT	102
VB	..CA.CCCAGACC.....G..C..CTAC..A..C.....G..GA.C..G..CA.C	120
VA	GAGGAGAGCATCCTGACTCTGTTGACATCCCGAAGTAATGCTCAGCGCCAGGAAATCTCT	162
VB	...C..GCT...A.CGA.G..C.C..CAAGA....C..CA.G.....G...C.G...G.C	180
VA	GCAGCTTTTAAAGACTCTGTTTGGCAGGGATCTTCTGGATGACCTGAAATCAGAACTAACT	222
VB	AAGT.C..C...G...A...C....A...C..CACT..G.C.T....G..T..G..C.G.	240
VA	GGAAAATTTGAAAAATTAATTGTGGCTCTGATGAAACCCTCTCGGCTTTATGATGCTTAT	282
VB	..C..G.....G.GGC.C.....C..T...T.T..GC.ATACAGA..C..A..CA.G	300
VA	GAACTGAAACATGCCTTGAAGGGAGCTGGAACAAATGAAAAAGTACTGACAGAAATTATT	342
VB	..G...C.TG.C...A.....CTTA.....C..G..GGGT..CA.C.TT..G..CC.G	360
VA	GCTTCAAGGACACCTGAAGAACTGAGAGCCATCAAACAAGTTTATGAAGAAGAATATGGC	402
VB	..C..TC....CAAGA.CC.G...C.G.AG..A.TGA.G.CG.....G.....C.....G	420
VA	TCAAGCCTGGAAGATGACGTGGTGGGGGACACTTCAGGGTACTACCAGCGGATGTTGGTG	462
VB	..C.....G..G...A.CCAA.CA.....AAGT..C...CTGG..A....CC.....	480
VA	GTTCTGCTTCAGGCTAACAGAGACCCTGATGCTGGAATTGATGAAGCTCAAGTTGAACAA	522
VB	TGC.....G....GC.G...G..TGA..TGAGCA.CT...TG..CCGGC.C.G.CC.TC	540
VA	GATGCTCAGGCTTTATTTTCAAGGCTGGAGAACTTAAATGGGGGACAGATGAAGAAAAGTTT	582
VB	C.A.ACGCACAGGATC.GT.T..G.C..GCGAG..GATTC.TGGGAC...T..G.T.AAA	600
VA	ATCACCATCTTTTGAACACGAAGTGTGTCTCATTTGAG...AAAGGTGTTTGACAAGTAC	639
VB	T...T..C.A.CCTGTGCACGC.CAGTG.CAC.CACCTGCTG.GA.....AG....T	660

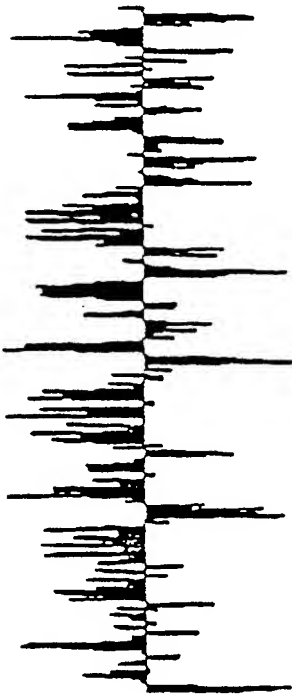
FIG. 12/1



VA	ATGACTATATCAGGATTTCAAATTGAGGAAACCATTGACCGCGAGACTTCTGGCAATTTA	699
VB	GA..AA..TG.CAACAAGAGC.....C.G...CA.GA.T.....CCA....TCAC.G	720
VA	GAGCAACTACTCCTTGCTGTTGTGAAATCTATTGGAAGTATACCTGCCTACCTTGCAGAG	759
VB	...G.GGCCA.G..CA....G.....GC.CC.A..ACC.C.ACAG....T.....	780
VA	ACCCTCTATTATGCTATGAAGGGAGCTGGGACAGATGATCATACCCTCATCAGAGTCATG	819
VB	.GA.....C....CC.....A.....GCG....GGG.....G..A...AA...C	840
VA	GTTTCCAGGAGTGAGATTGATCTGTTTAACATCAGGAAGGAGTTTAGGAAGAATTTTGCC	879
VB	.....A.....C.....CT.AAA.CTT....AATGTC.C..C.A.....TG.AC.G.	900
VA	ACCTCTCTTTATTCCATGATTAAAGGGAGATACATGTGGGGACTATAAGAAAGCTCTTCTG	939
VB	.AGA.C..CAGCAG.....C.T..A...C..CAGC..C.....C.....C..C..G...	960
VA	CTGCTCTGTGGAGAAGATGAC	960
VB	AGC..GGTG..CAGC..CCC.	981

FIG. 12/2

HYDROPHOBIC | HYDROPHILIC



HYDROPHOBIC | HYDROPHILIC



FIG. 13.

VAC-beta

VAC-alpha

## Comparison VAC/VAC-beta/Lipocortin I/Lipocortin II

VA	MAQVLRGTVDTPPGFDERA	PSRLY	ANRDPDAG-IDEAQVEQ
VB	MAWKAAMIEQEGVTVKSSSHFNPD	PPYRY	GSRDDVSSFVDPALALQ
LCI	MAMVSEFLKQAWFIENEEQYVQTVKSSKGGPCSAVSPYPTFNPS	TPAQF	GDRSEDFGVNED-LADS
LCII	MSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSAVKPYTNFDAER	TPAQY	GRRAEDEGVIDYELIDQ
VA	DAETLRKAMKGLGTDDEESILTLTSRSNAQRQEIISAAFKTLFGRDLLDLKSELIGKFEKLIIVALMK		
VB	DAETLYKAMKGLGTNEQAIIDVLTKRNTQRQIAKSFKAQFGKDLTETLKSELSGKFERLIIVALMY		
LCI	DVAALHKAIMVKGVDDEATIIDILTKRNNAGRQIIKAAYLQETCKPLDETLLKALIGHLEEVVLALLK		
LCII	DALNIETAVTKGVDEVTIVNLTNRSNVQRQIIAFAYQRRTKKELPSALKSALSCHLETVILGLLK		
VA	DAYELKHALKGACTNEKVLTEIIASRTPEELRAIKQVYEEYSSLEDDVVGDTSYQRMVLVLLQ		
VB	EAKELHDAMKGLGTKEGVIIEILASRTKNQLREIMKAYEEDYGSSEEDIQADTSGLYERILVCLLQ		
LCI	DADELRAAMKGLGTDEDTLIEILASRTNKEIRDINRVYREELKHDLAKDITSDTSGDFRNALLSLAK		
LCII	DASELKASKMGLGTDEDSLIEIICSRTNQELQEIINRVYKEMKYTDLEKDIISDTSGDFRKLMLVALAK		
VA	DAQALFQAGELKVGTDDEKFTITIFGTRSVSHLKKVFDKYMTISGFOIEETIDRETSGNLEQLLLAVVK	SIRSIPAY	
VB	DAQDLYAAGEKIRGTDENKFTITILCTRSATHLLRVFEYEEKIANKSIEDSIKSETHGSLEEAMLTVVK	CTQNLSHY	
LCI	DARALYEAGERRKGTDVNVFNTILTTRSYPLRRVFKYTKYSKHDNNKVLDELKGDIEKCLTAIVK	CATSKPAF	
LCII	DARELYDAGVKRKGTDPVKWISIMTERSVCMLQKVFERYSYSPYDNLESIKKEVKGDLENAFNLVQ	CIONKPLY	
VA	LAETLYYAMKGAGTDDHTLIRVMVSRSEIDLFINKEFRKNFATSLYSMIKGTSGDYKKALLLLCG	EDD*	
VB	FAERLYYAMKGAGTRDGTILRNIVSRSEIDLNLKCHFKKMYGKTLSSMIMEDTSGDYKNALLSLVG	SDP*	
LCI	FAEKLHQAMKGVGTRHKALIRIMVSRSEIDMNDIKAFYQKMYGISLCOAILDETKGDYKELILVALCG	GN*	
LCII	FADRLYDSMKGKGTDRDKVLIRIMVSRSEVDMLKIRSEFKRKYGKSLYYYIQQDTKGDYQKALLYCG	GDD*	
VA	human		
VB	VAC-alpha		
LCI	human		
LCII	VAC-beta		
VA	human		
VB	Lipocortin I		
LCI	human		
LCII	Lipocortin II		

FIG. 14.

Sequence of the alkaline phosphatase gene component in  
plasmid pRH284T

```

      10      20      30      40      50      60
AATTGGAGATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATGGCGCAAAATGACCAACAGCGGT
  CCTCTAATAGCAGTGACGTTACGAAGCGTTATACCGCGTTTTACTGGTTGTCGCCA.

      70      80      90     100     110     120
TGATTGATCAGGTAGAGGGGGCGCTGTACGAGGTAAAGCCCGATGCCAGCATTCCCTGACG
  ACTAACTAGTCCATCTCCCCCGGACATGCTCCATTTCGGGCTACGGTCGTAAGGACTGC

      130     140     150     160     170     180
ACGATACGGAGCTGCTGCGCGATTACGTAAAGAAGTTATTGAAGCATCCTCGTCAGTAAA
  TGCTATGCCTCGACGACGCGCTAATGCATTTCTTCAATAACTTCGTAGGAGCAGTCATTT

      190     200     210     220     230     240
AAGTTAATCTTTTTCAACAGCTGTCATAAAGTTGTCACGGCCGAGACTTATAGTCGCTTTG
  TTCAATTAGAAAAAGTTGTCGACAGTATTTCAACAGTGCCGGCTCTGAATATCAGCGAAAC

      250     260     270     280     290     300
TTTTTATTTTTTAATGTATTGCTCGAGAGGTTGAGGTGATTTTATGAGCTCGAATTCAT
  AAAAATAAAAAATTACATAAACGAGCTCTCCAACCTCCACTAAAATACTCGAGCTTAAGTA
                XhoI          RBS          SacI  EcoRI C

      310     320     330     340     350
CGATAAGCTTGGATCCGTCGACCGCGCCCGGCAGTGAATTTTCGCTGCCGGGTGGTTTTT
  GCTATTTCGAACCTAGGCAGCTGGCGCGGGCCGTCACCTAAAAGCGACGGCCACCAAAAA
  laI HindIII BamHI SalI

      360     370
TTGCTGC
AACGACGAGCT

```

FIG. 15.

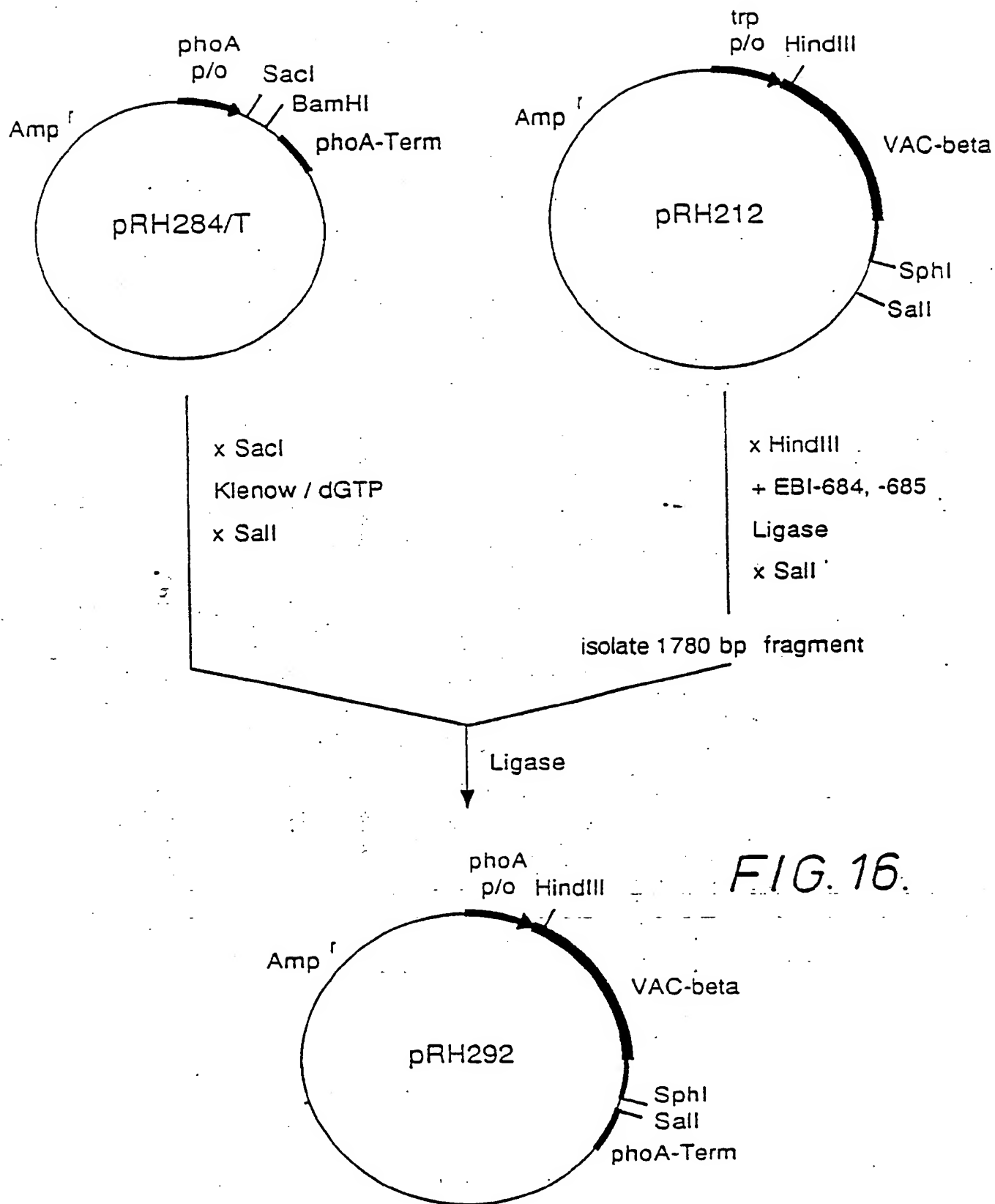
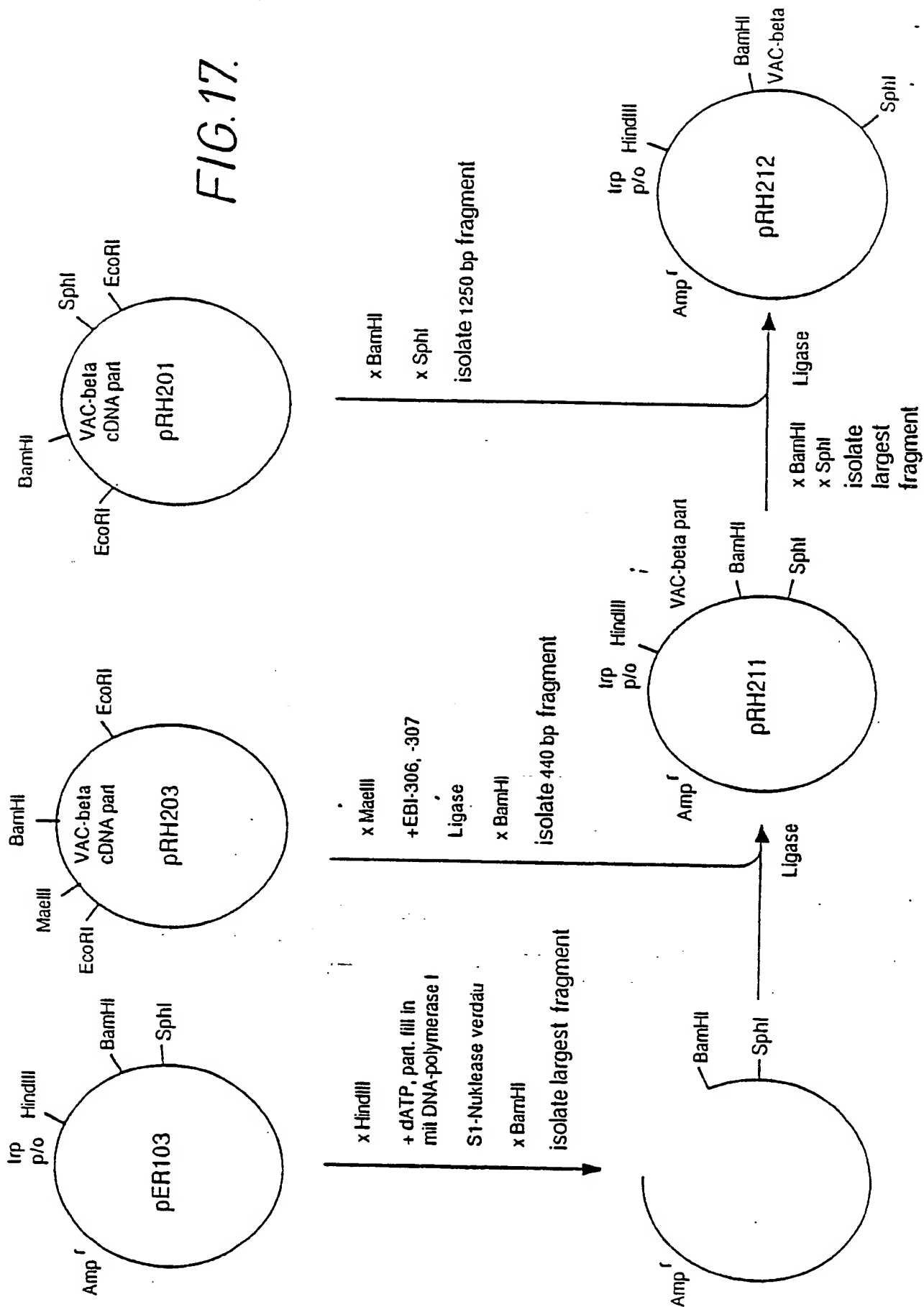


FIG. 16.

FIG. 17.



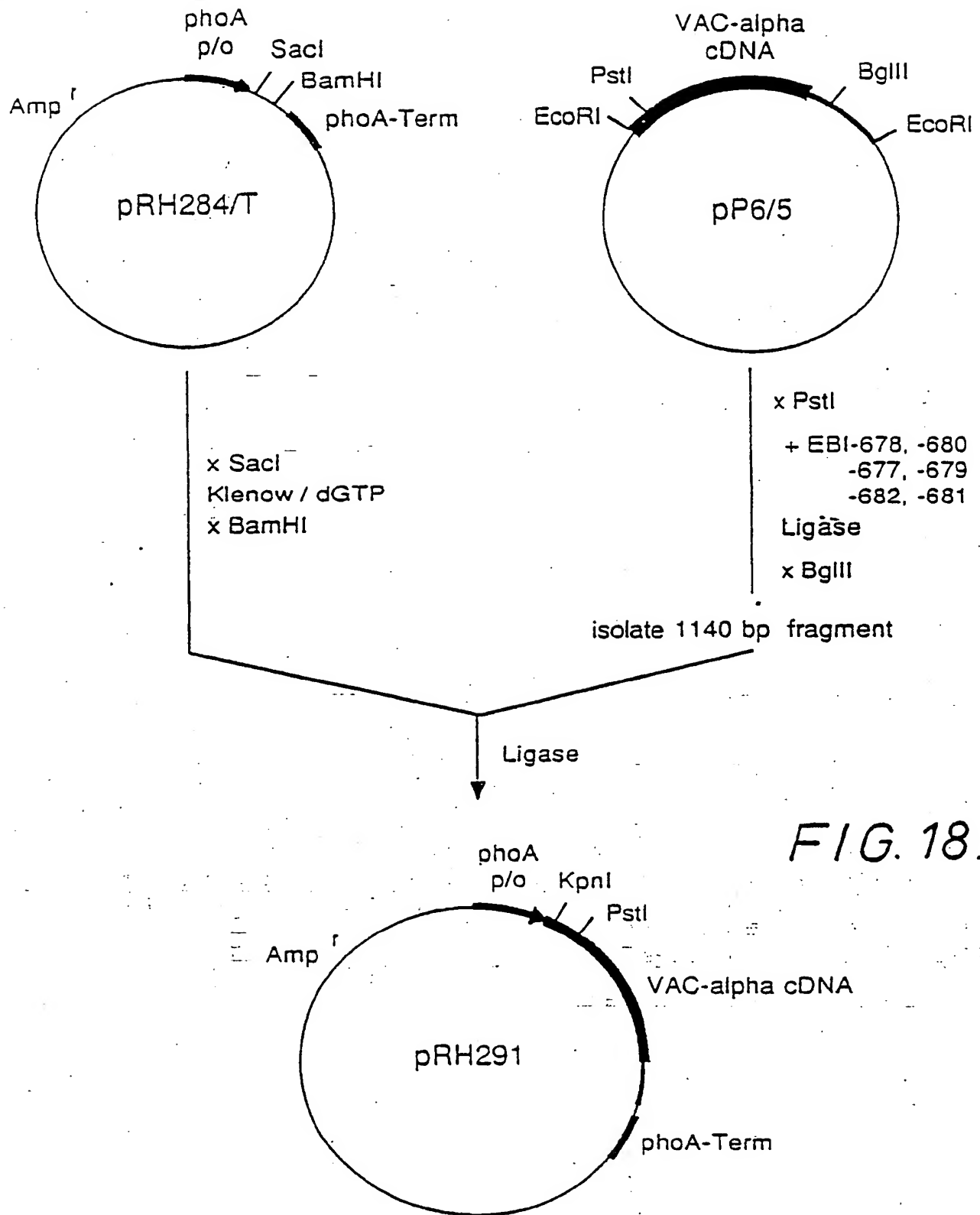


FIG. 18.

FIG. 19.

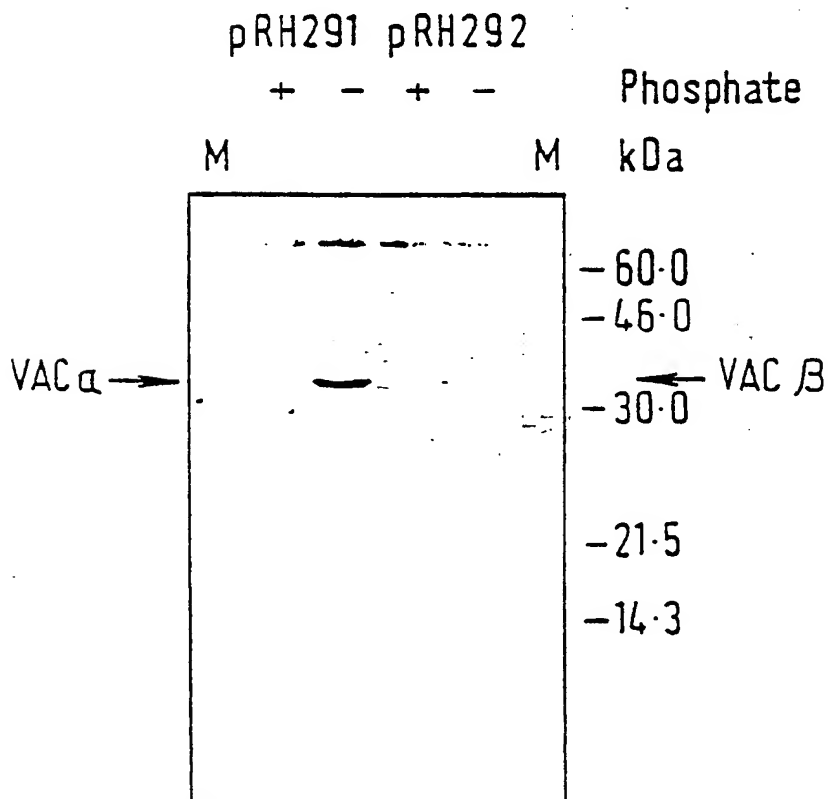
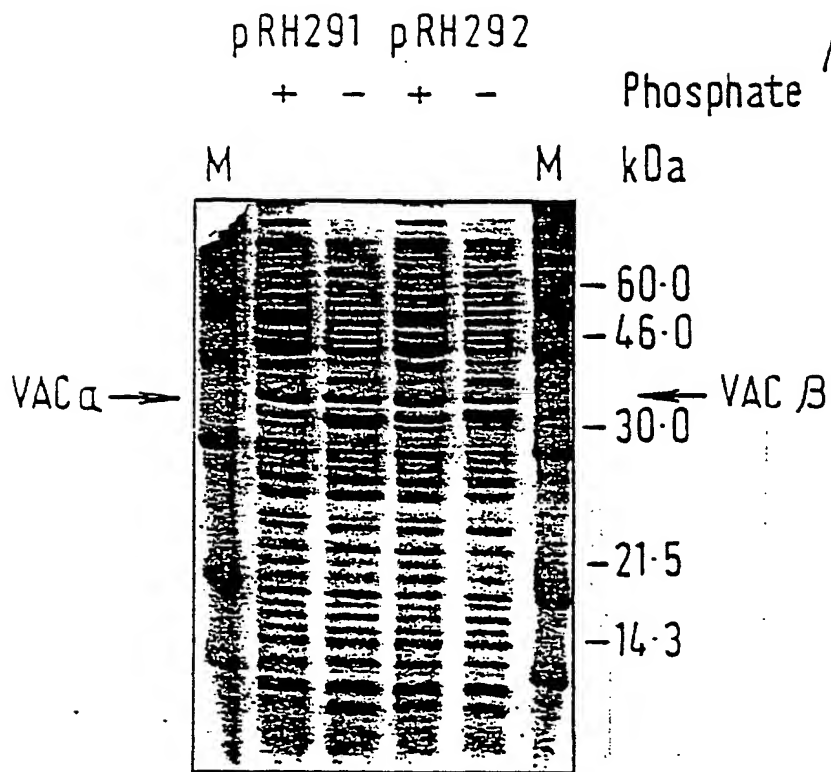




FIG. 20.

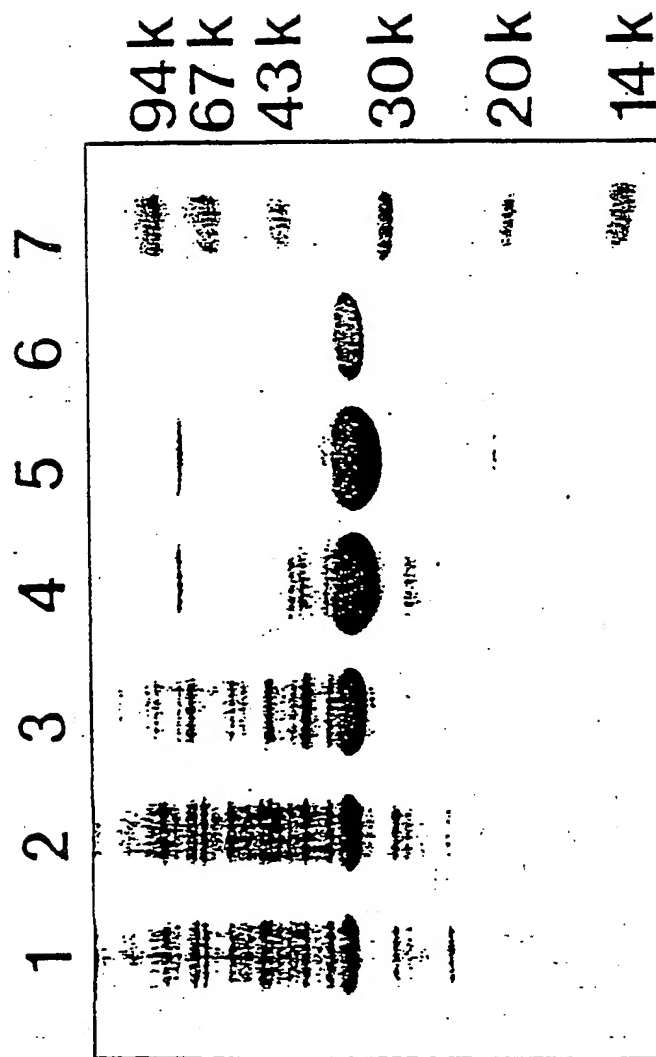


FIG. 21.

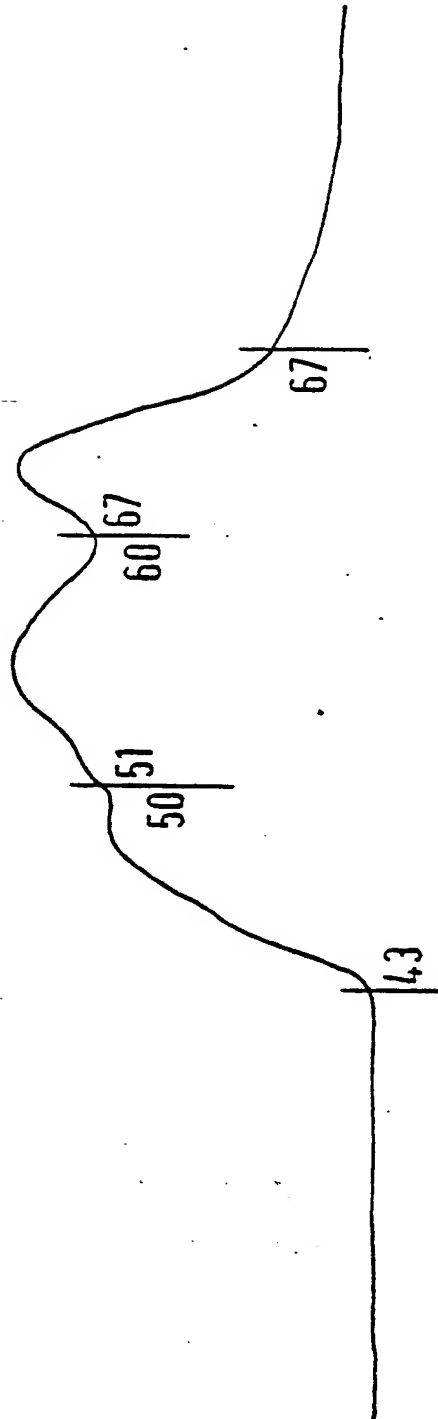


FIG. 22.

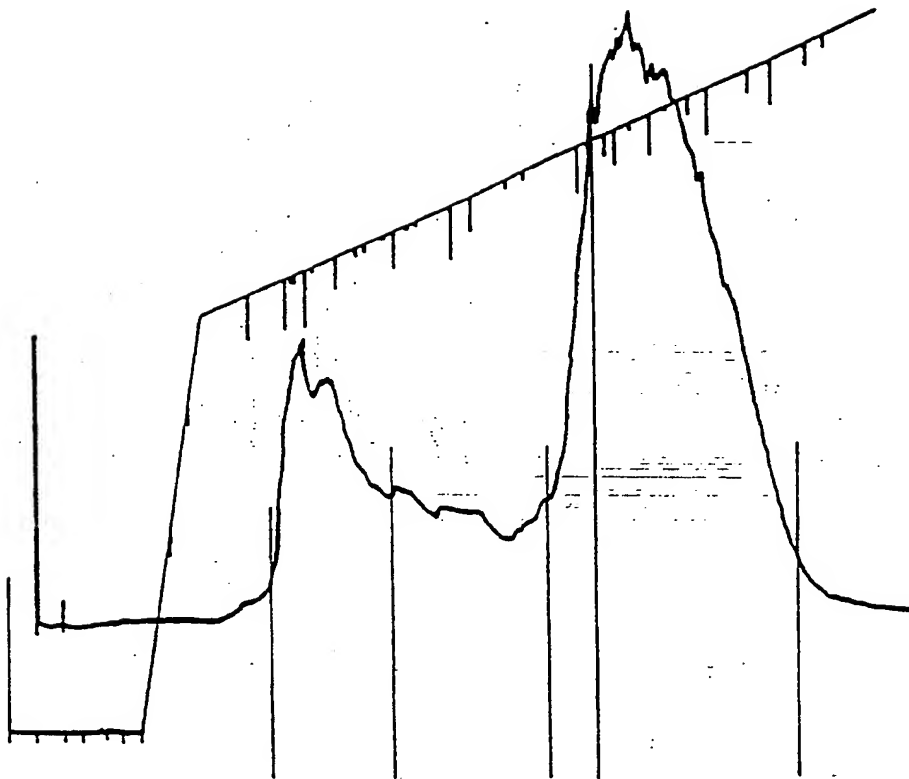
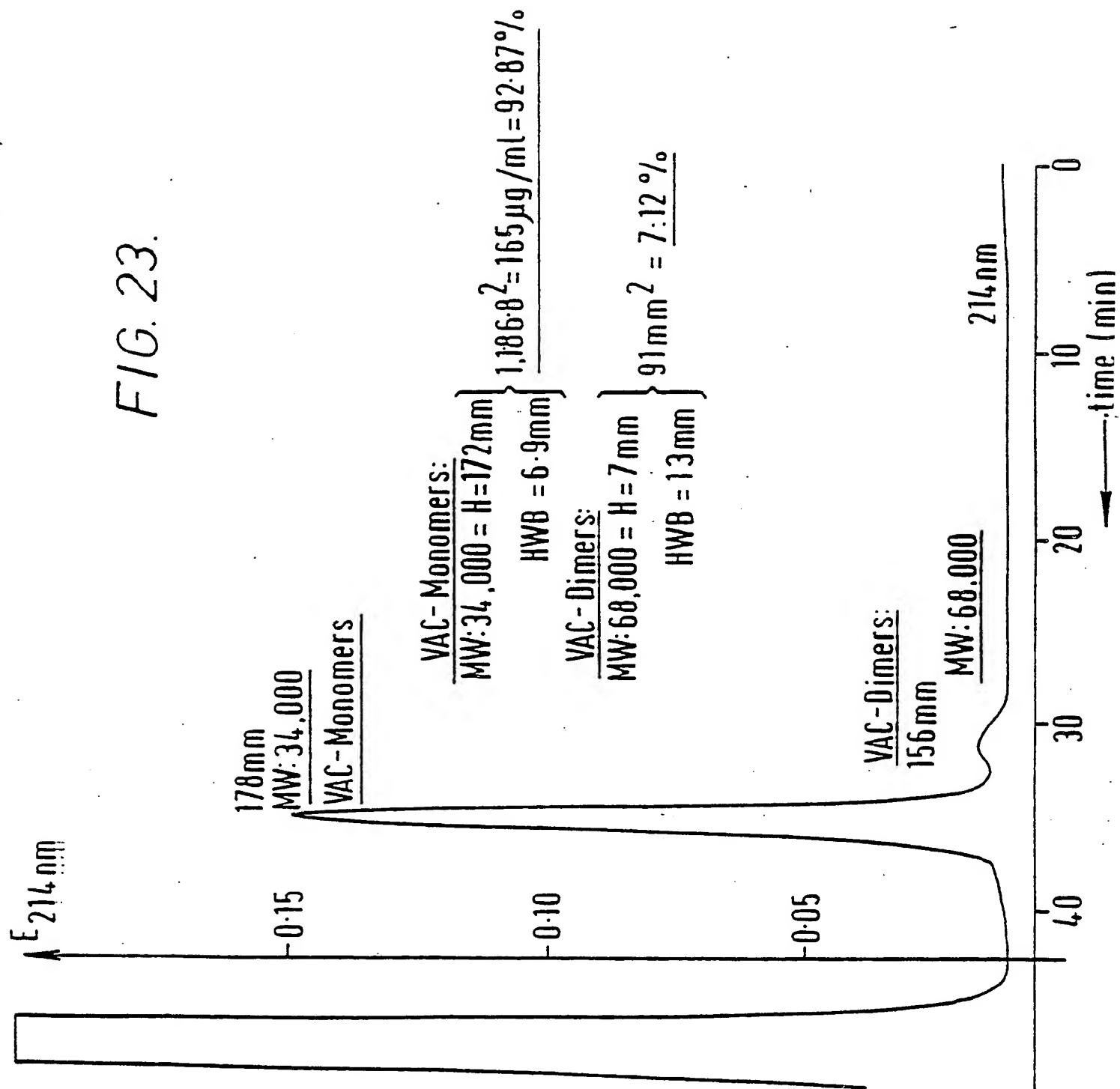


FIG. 23.



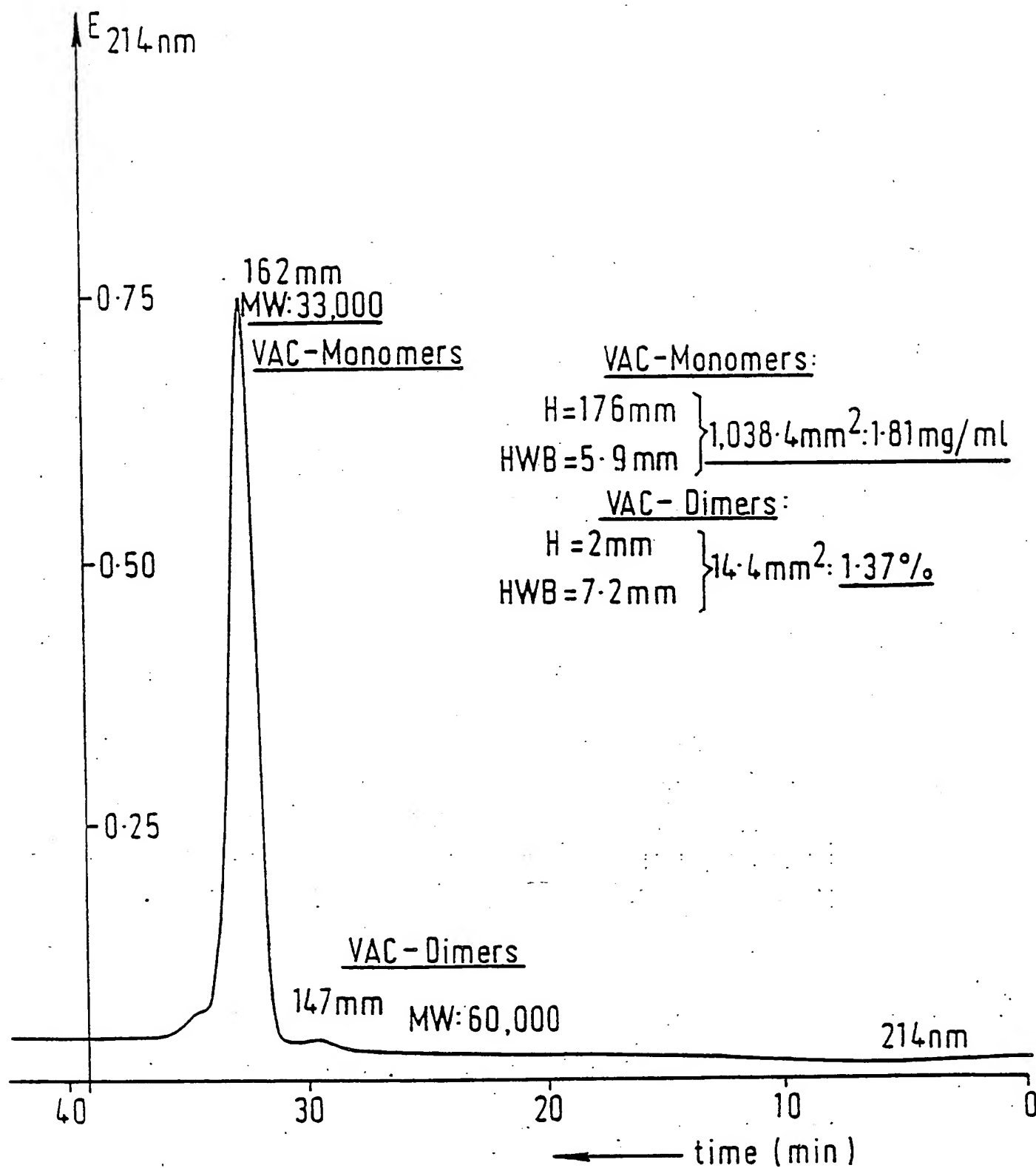


FIG. 24.

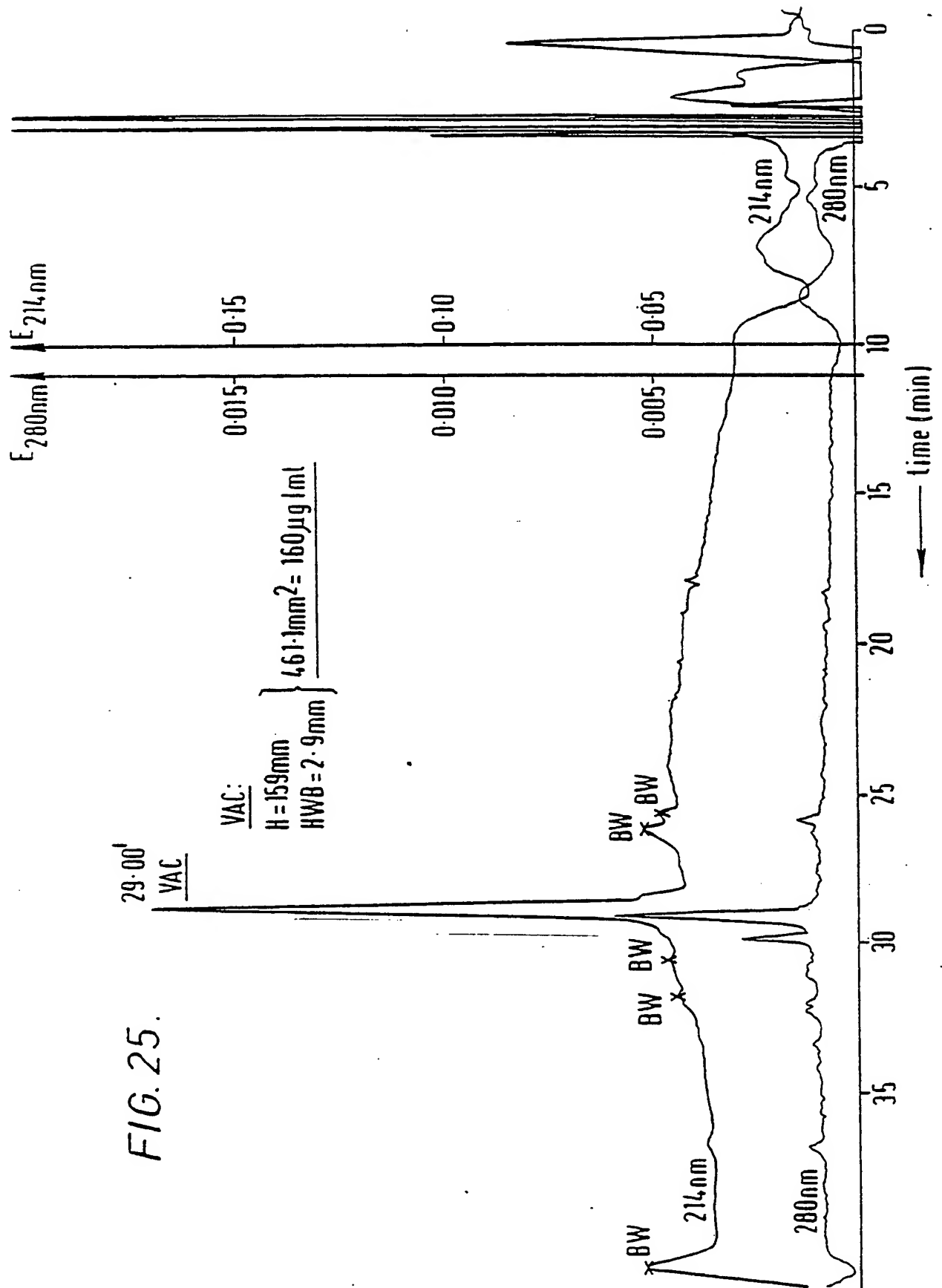


FIG. 25.

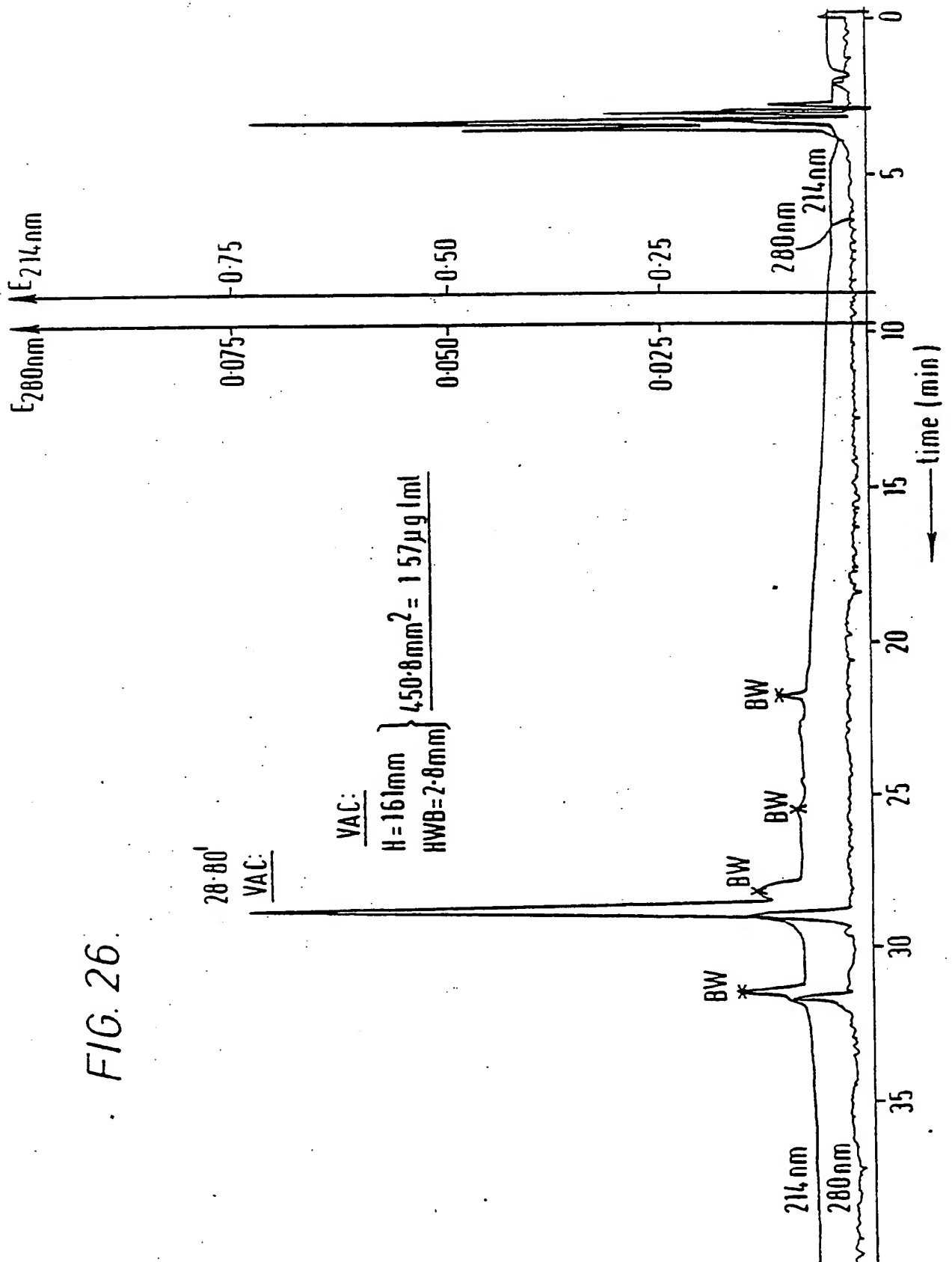


FIG. 26.

FIG. 27.

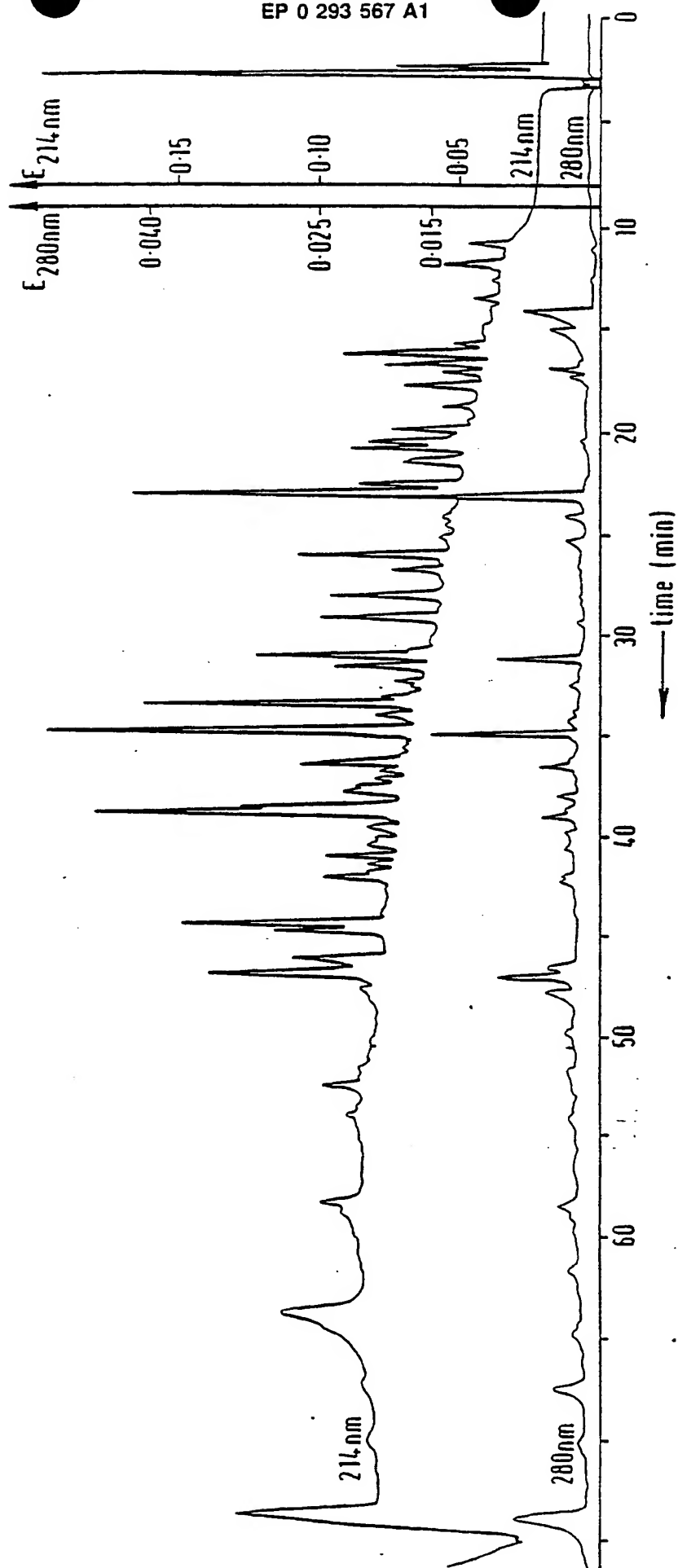




FIG. 28.

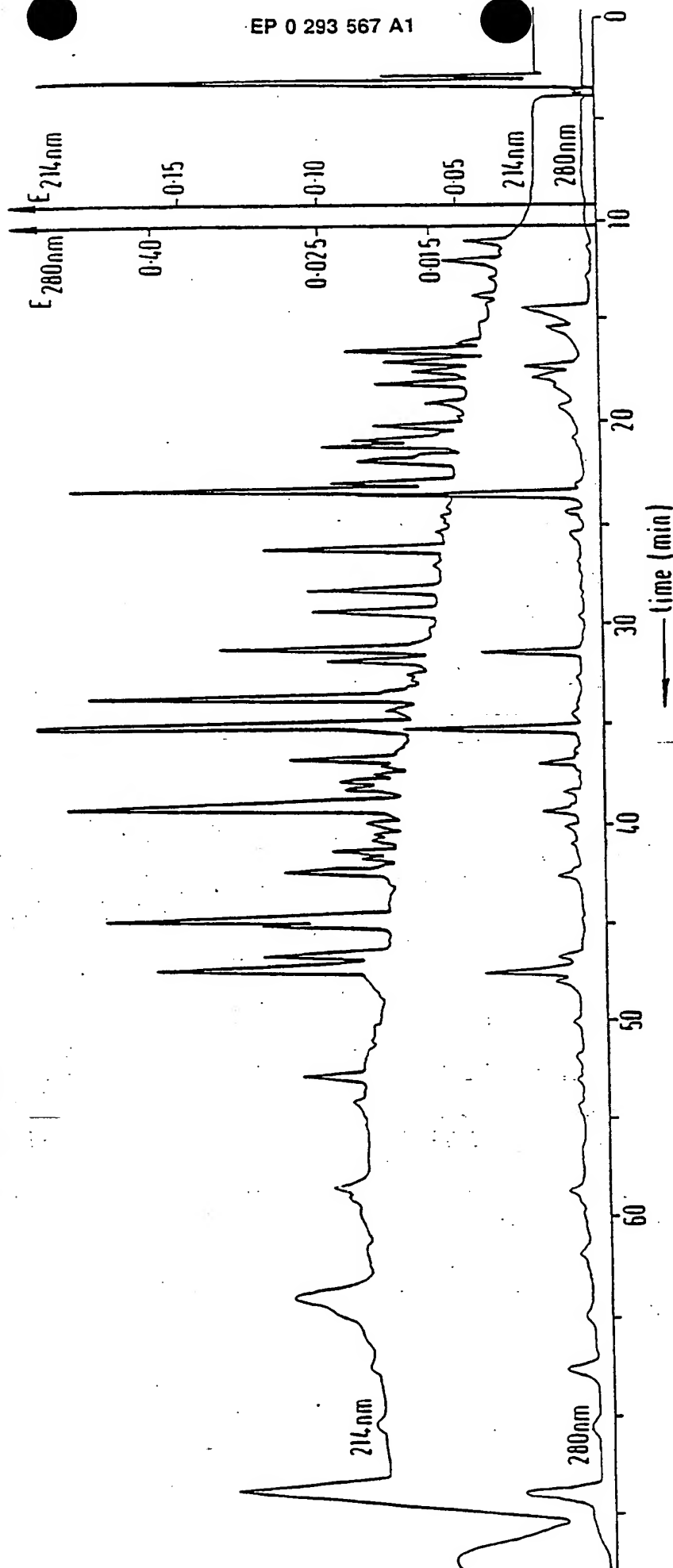
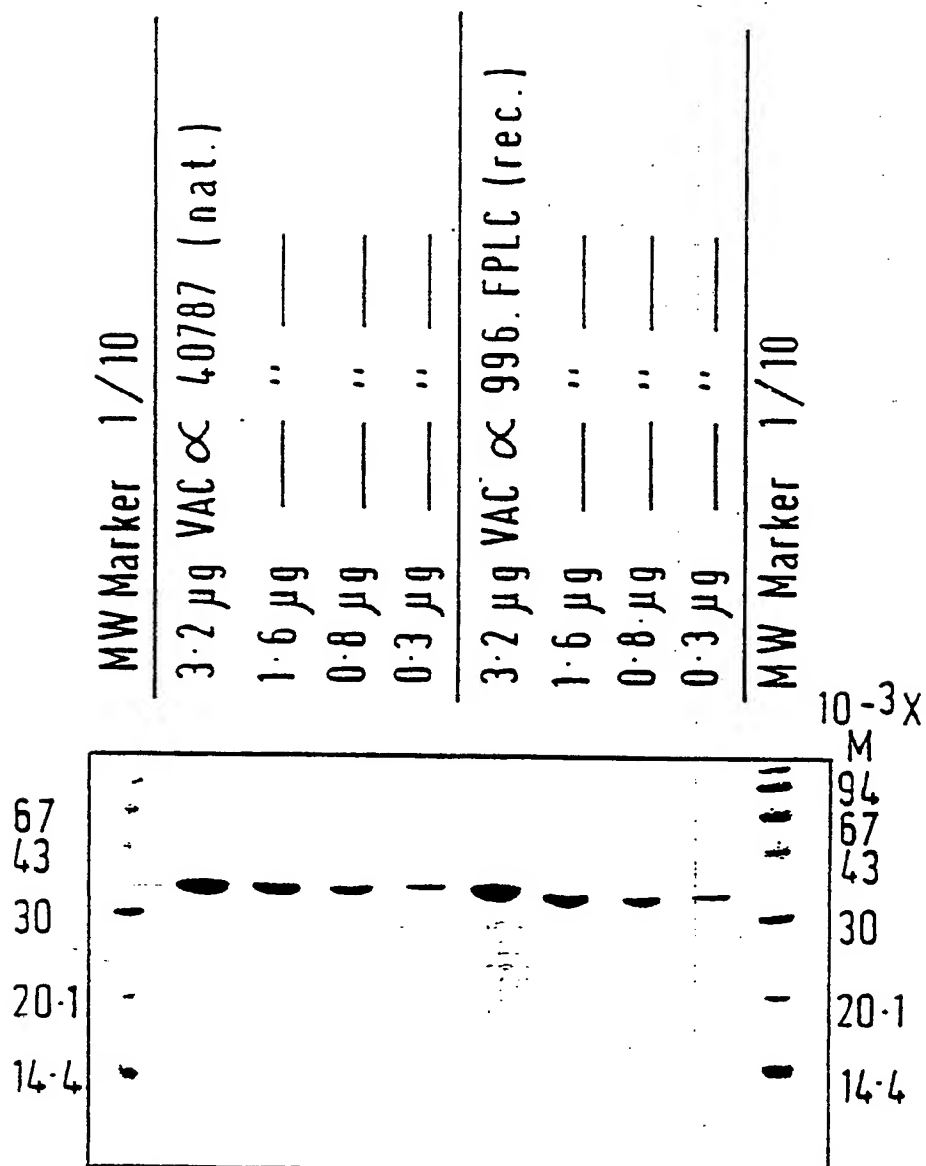


FIG. 29.



Coomassie - Blue

## FIG. 30.

15% SDS - PAGE

Gel part I: Silver staining  
 Gel part II: Coomassie staining

STACKING GEL

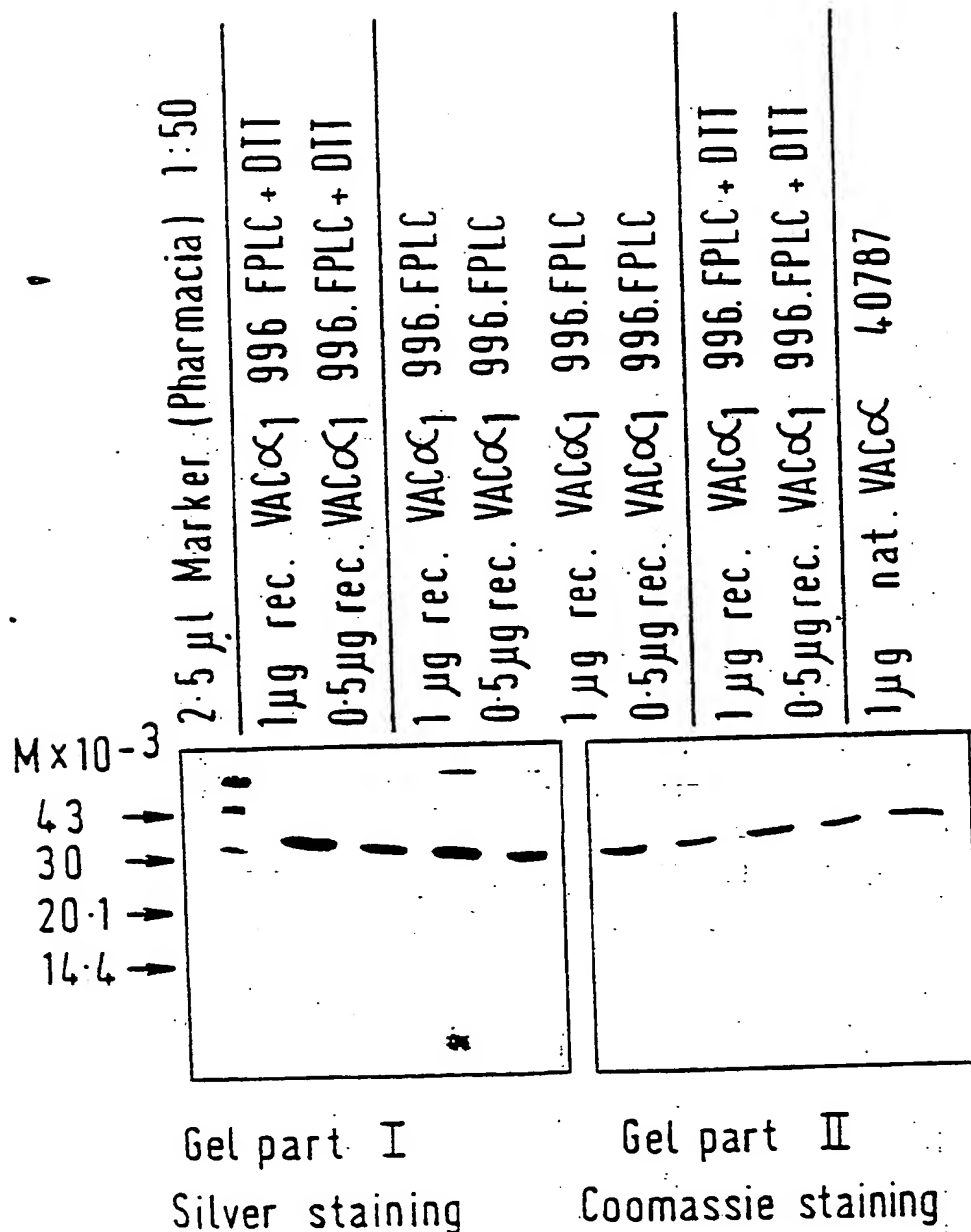
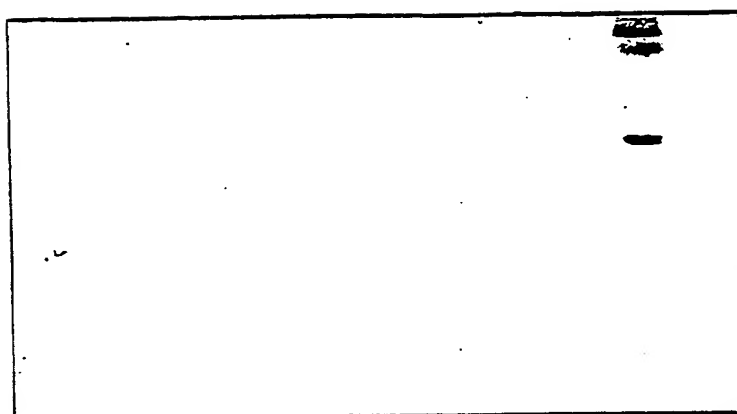


FIG. 31.

15% SDS - PAGE

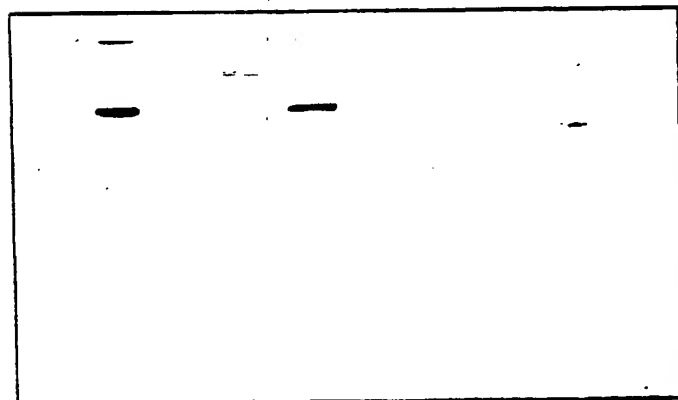
Western - Blot



Blotted gel

Coomassie staining

1  $\mu$ g r. VAC $\alpha$ 1 996.FPLC  
 0.1  $\mu$ g r. VAC $\alpha$ 1 996.FPLC  
 1  $\mu$ g n. VAC $\alpha$  40787  
 0.1  $\mu$ g n. VAC $\alpha$  40787  
 2  $\mu$ g r. VAC $\alpha$  996.FPLC  
 2  $\mu$ l Marker UV



MW  
 94 KD  
 67  
 43  
 30  
 20  
 14

immunological

NW

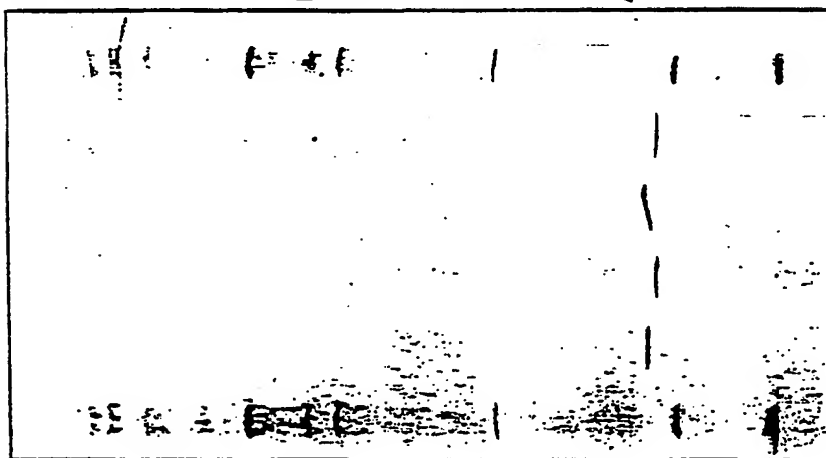
Protein staining  
 Amido black

## FIG. 32.

LKB AMPHOLINE PAGIF pH 3.5 - 9.5

Coomassie staining

trypsinogen (9.3)  
 lentil lectin - basic band (8.65)  
 lentil lectin - middle band (8.45)  
 lentil lectin - acidic band (8.15)  
 myoglobin - basic band (7.35)  
 myoglobin - acidic band (6.85)  
 human carbonic anhydrase B (6.55)  
 bovine carbonic anhydrase B (5.85)  
 $\beta$ -lactoglobulin A (5.2)  
 soybean trypsin inhibitor (4.55)  
 amyloglucosidase (3.5)



pI Marker (Pharmacia) 10 µl

4.2 µg nat. VAC 40787

4.2 µg rec. VAC 1004.FPLC

1 µg nat. VAC 40787

1 µg rec. VAC 1004.FPLC

pI Marker (Pharmacia) 10 µl

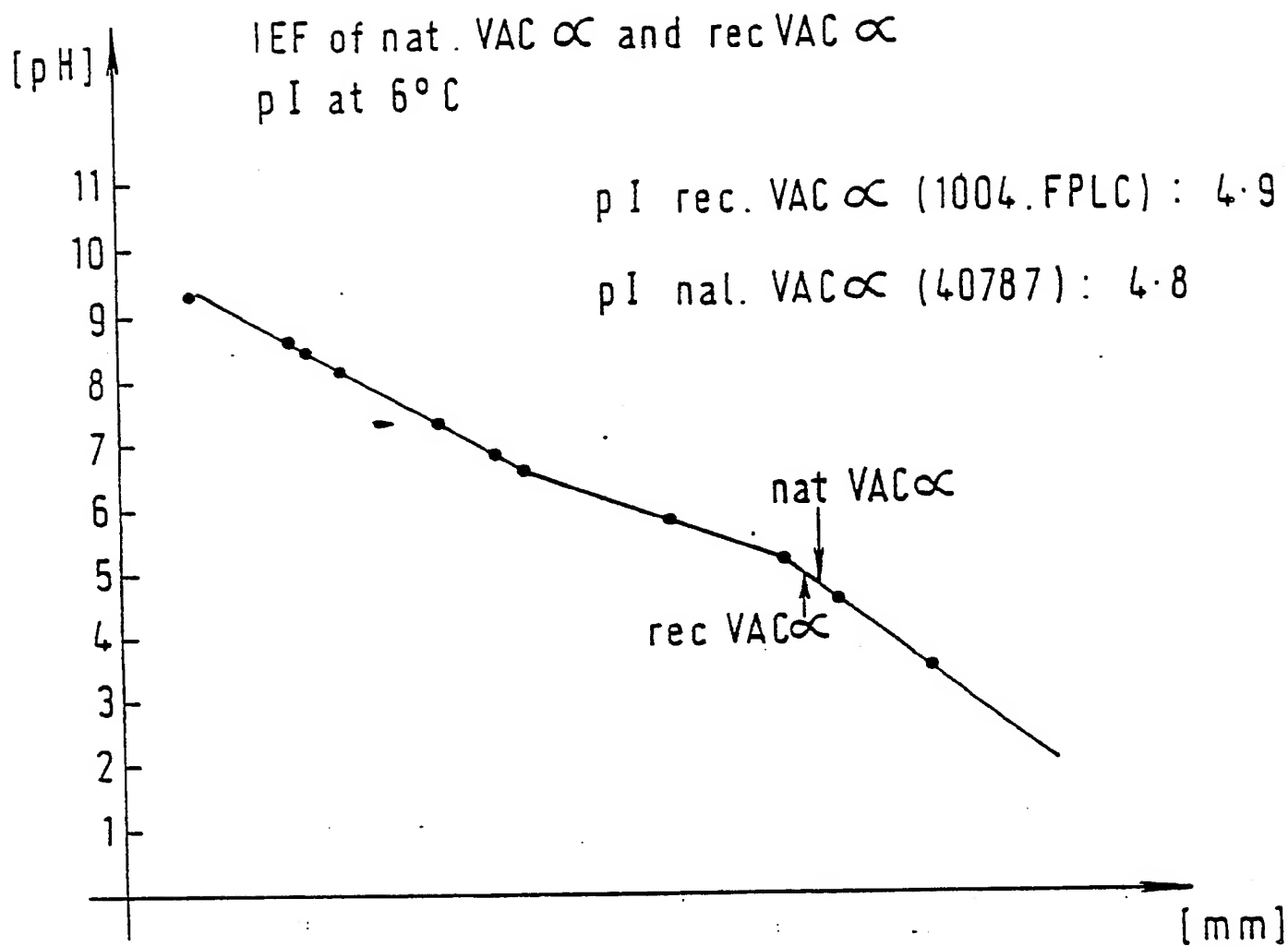
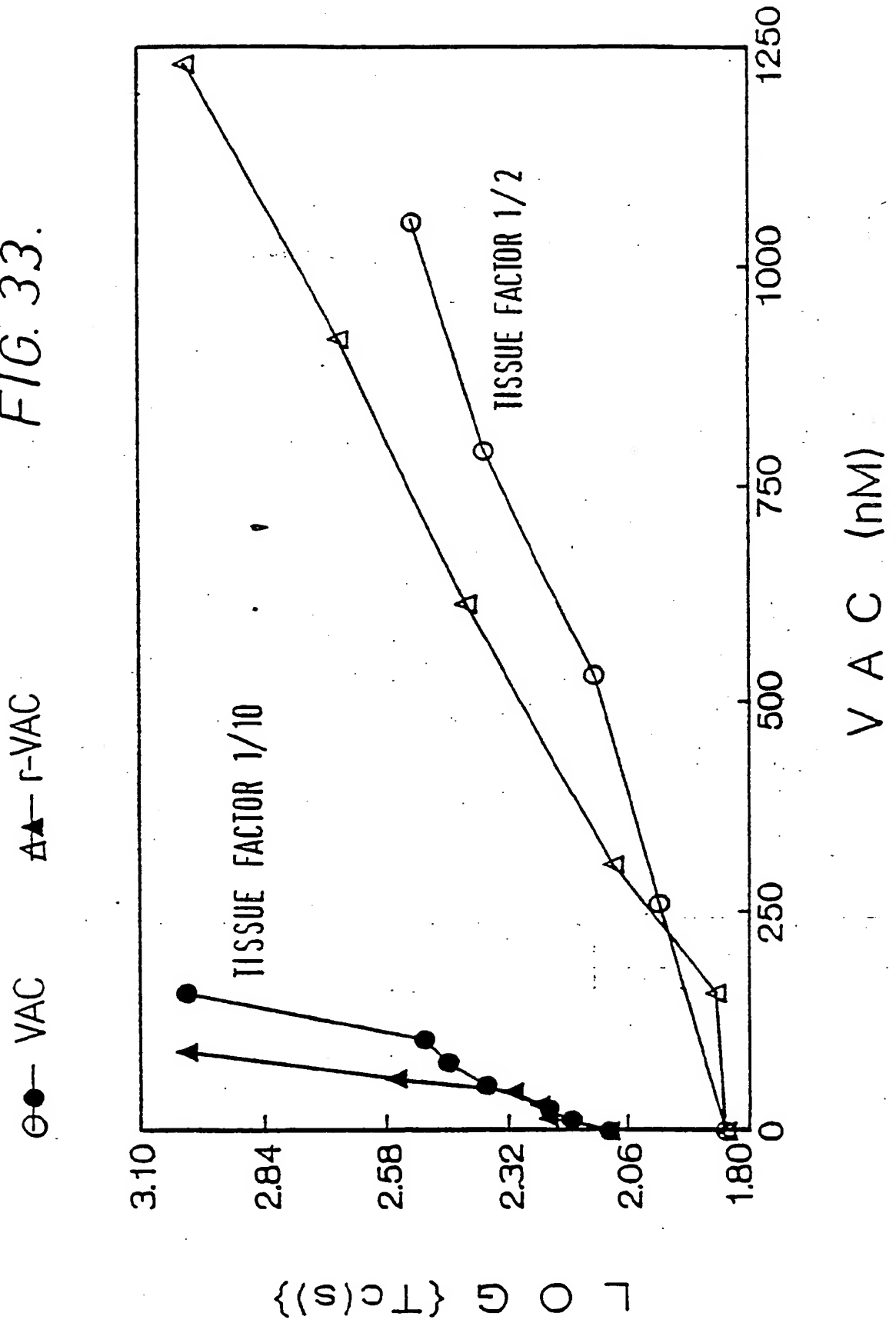


FIG. 32a.

FIG. 33.



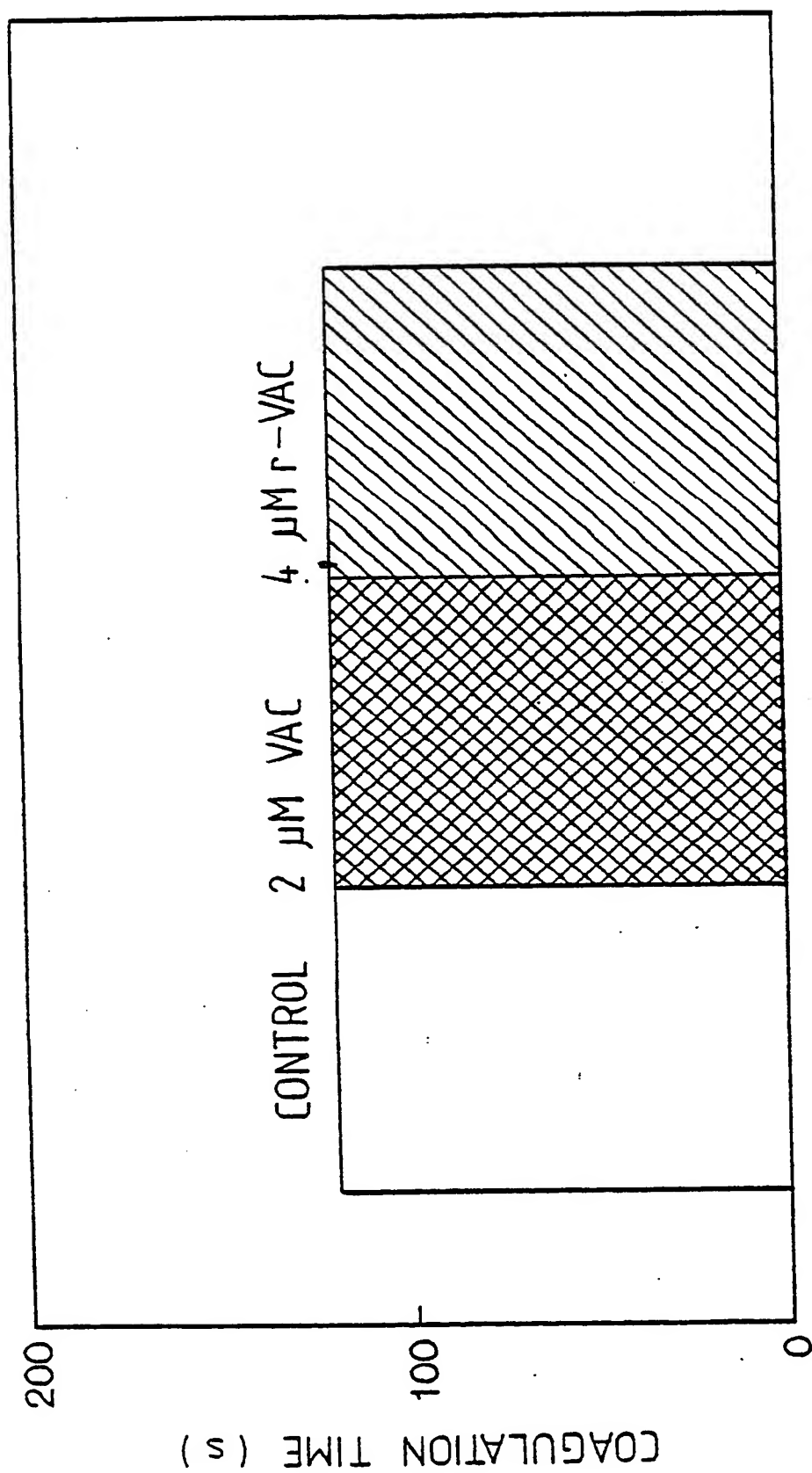


FIG. 34.



FIG. 35.

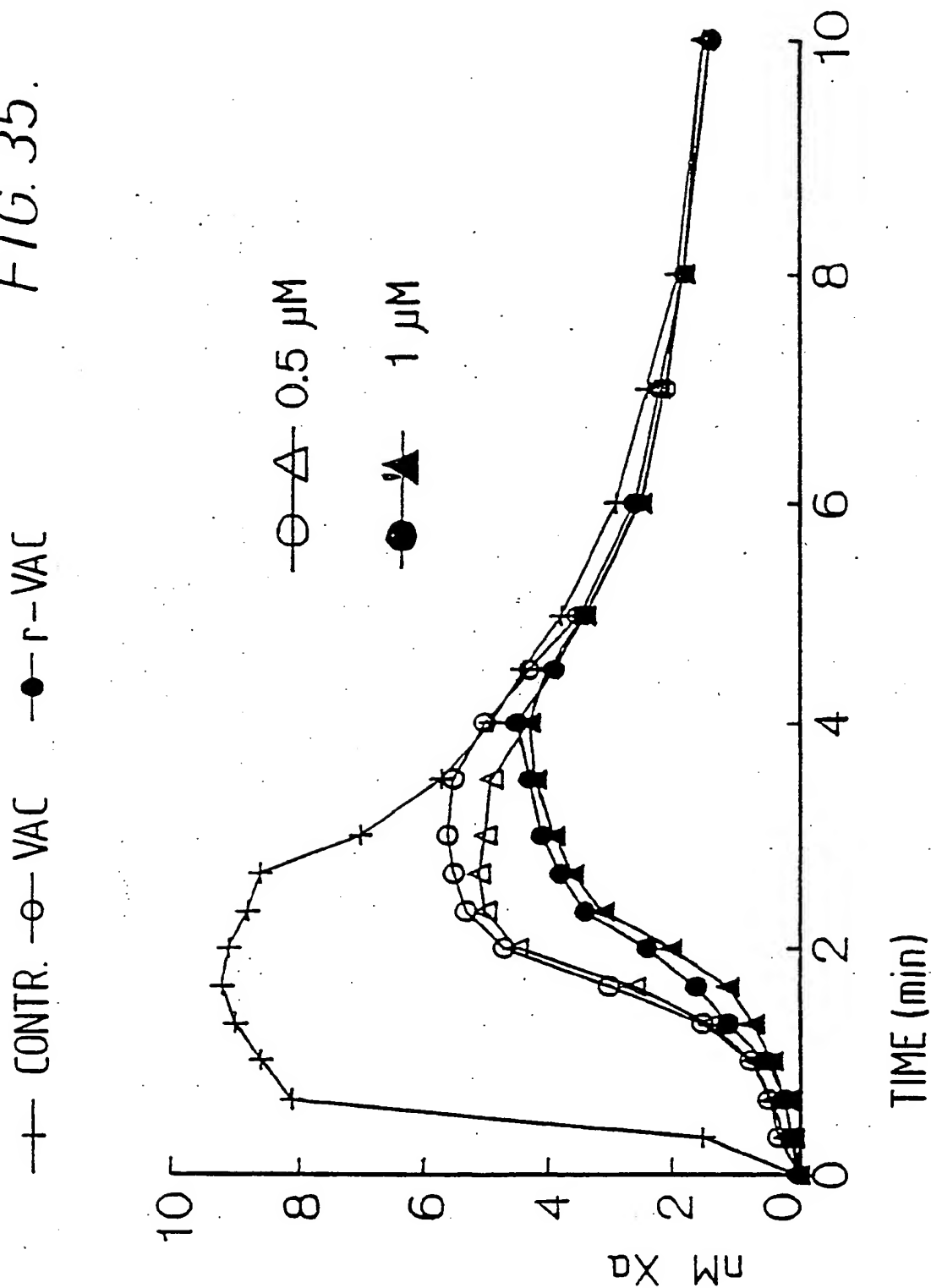


FIG. 36.

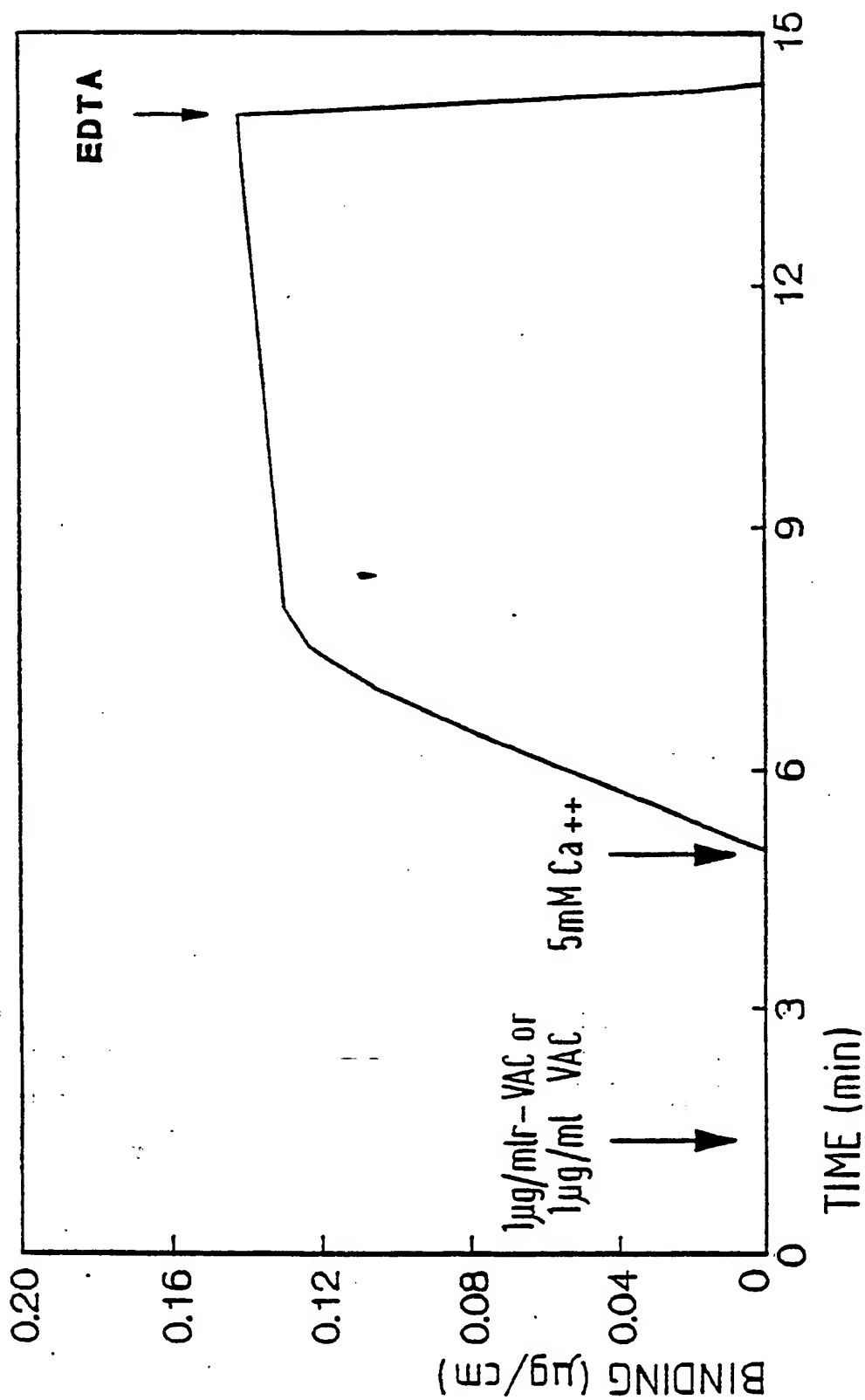
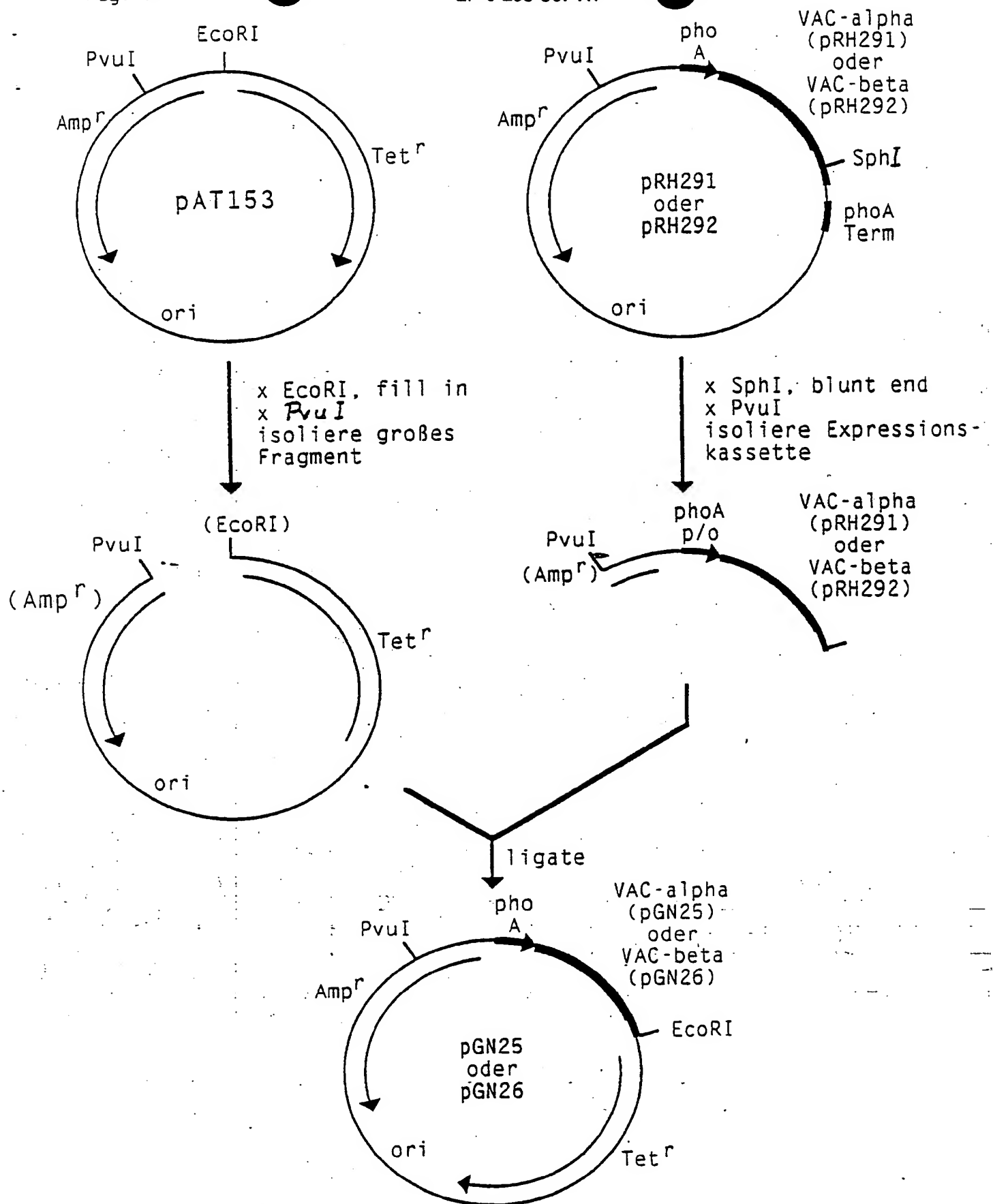


Fig. 37

EP 0 293 567 A1

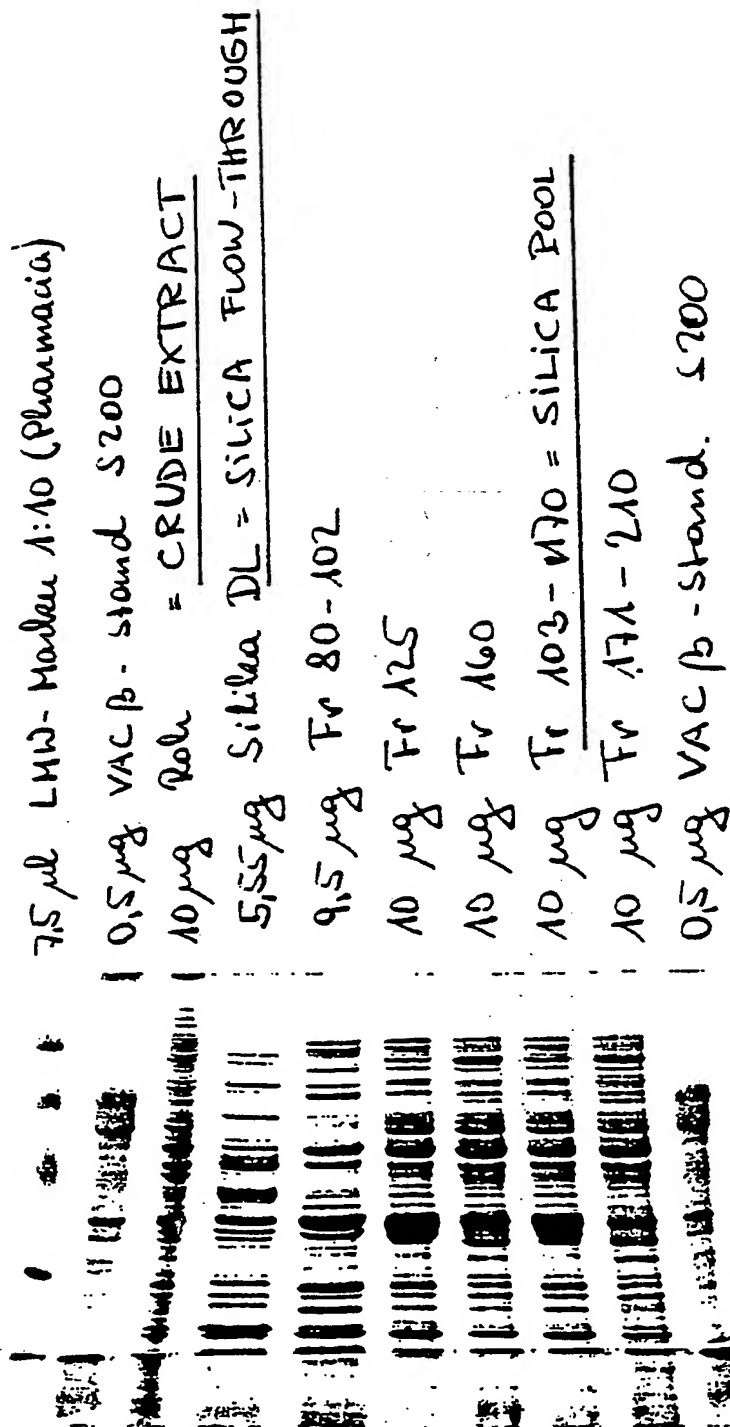


VACB-4

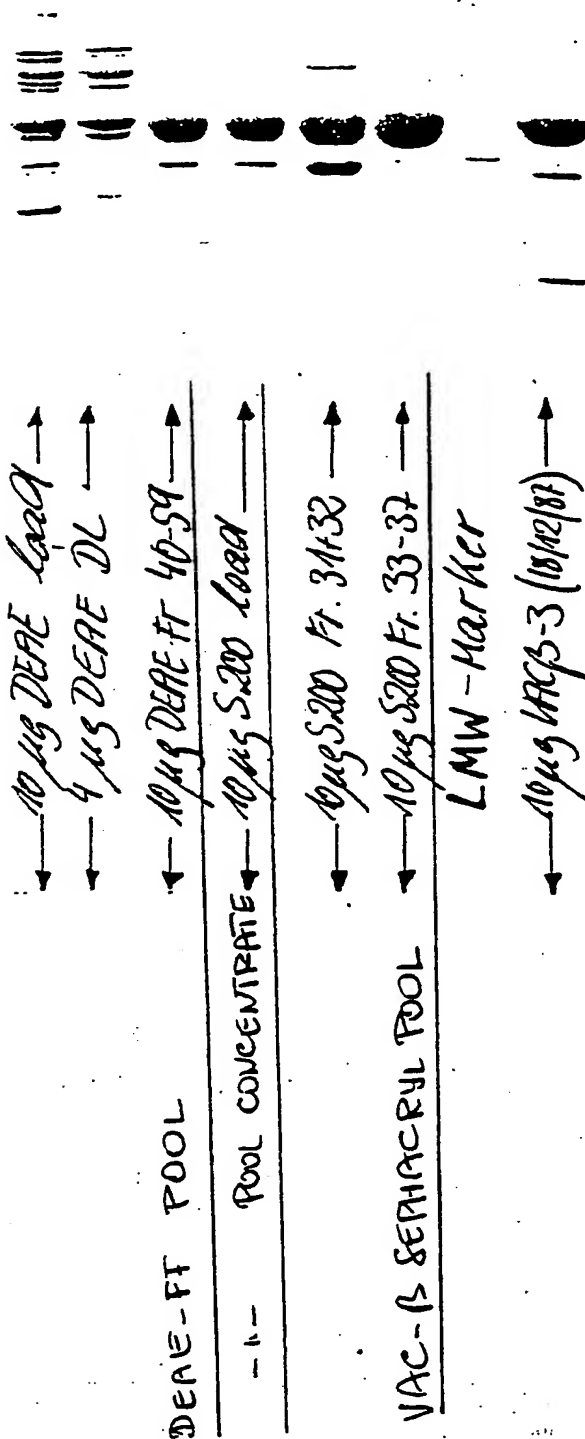
Fig. 38

12,5% SDS - PAGE

Coomassie färbung



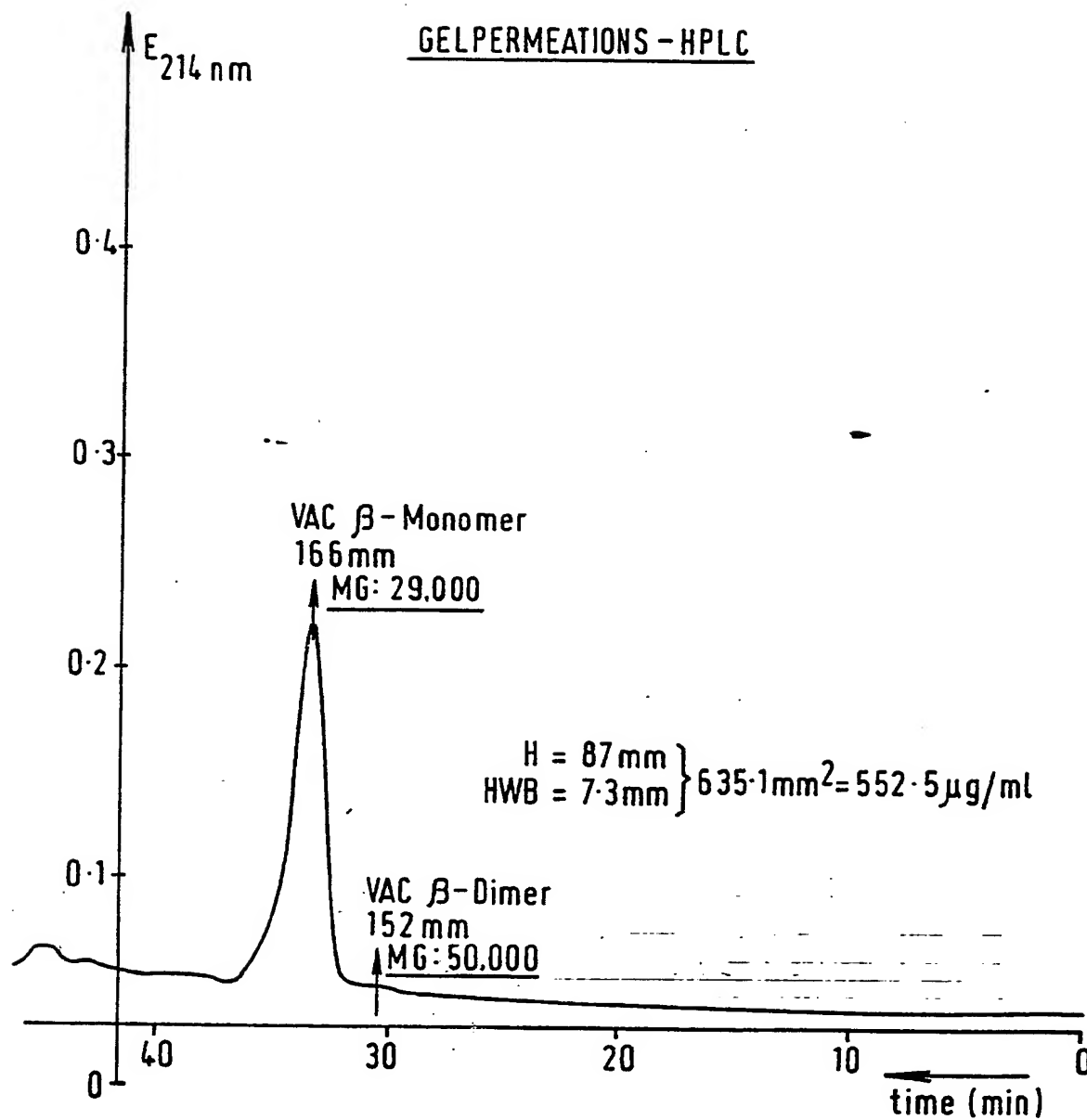
# 4. VAC $\beta$ in process Proben



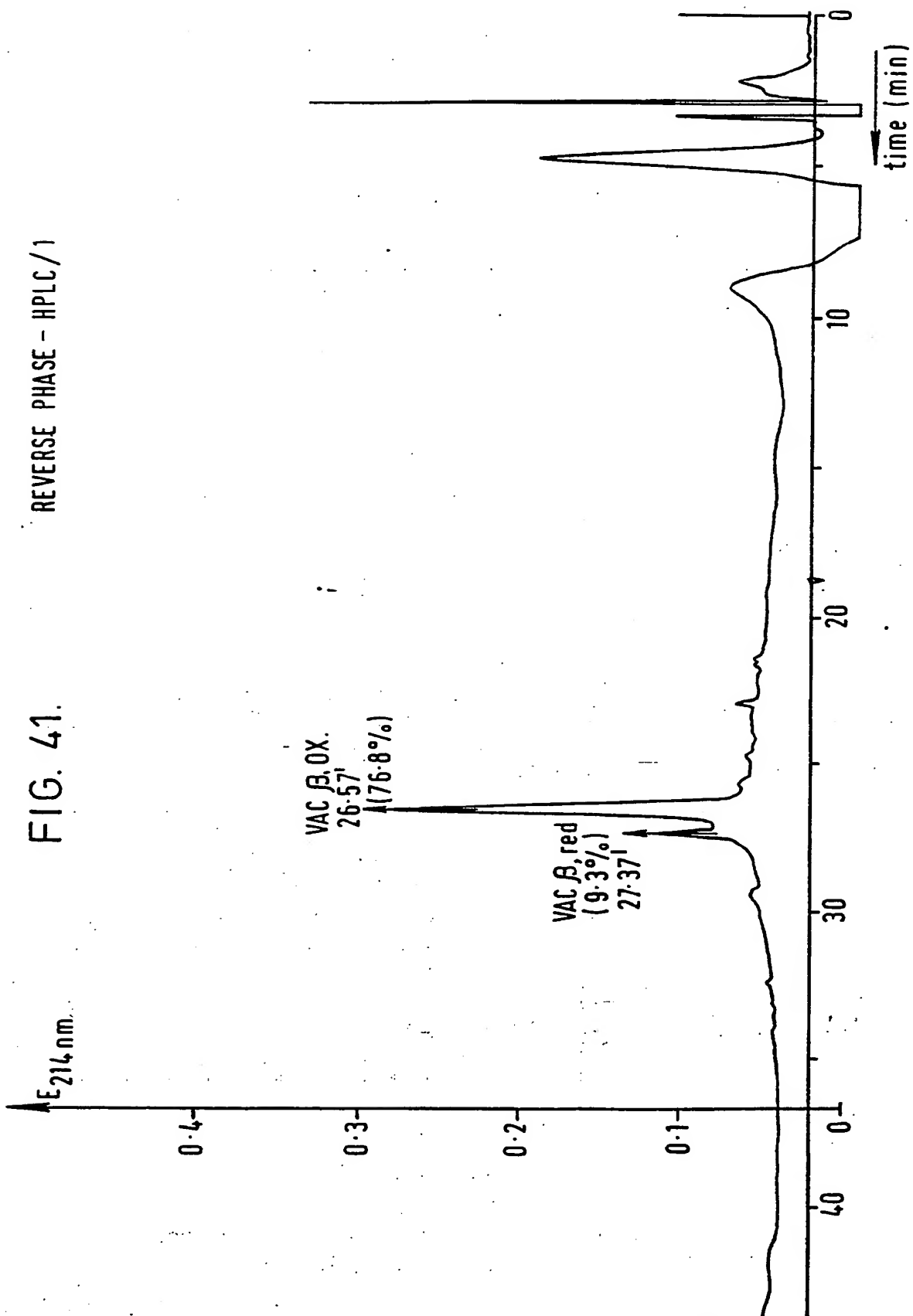
15% SDS-PAGE

+DTT

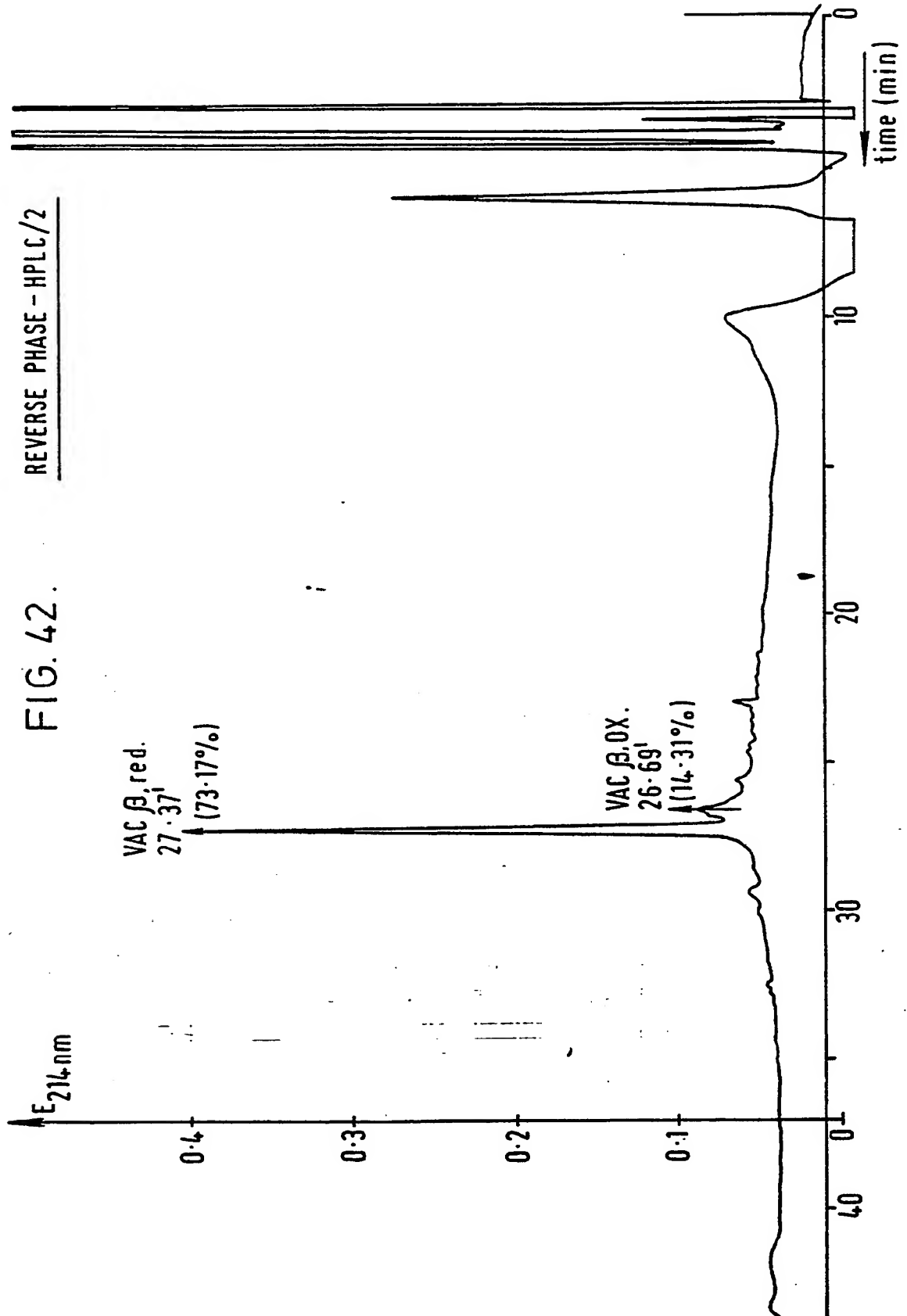
FIG. 40.



Neu eingereicht / newly filed  
Nouvellement déposée



Neu eingereicht / Newly filed  
Nouvellement déposé



Neu eingereicht / Newly filed  
Nouvellement déposé



## BECKMAN AMINOSÄUREANALYSE

01. Februar 1988

Probe: 3vacb

Laufnummer: 22

Protein: VAC "beta"

Fig. 43a

Chromatogramm vom: 21.04.88 3:17:38

Injiziertes Volumen: 50 µl

Standardwerte: Durchschnittswerte von Lauf 22

Name	IST	SOLL	rel IST (I)	rel IST (II)	rel SOLL
ASP	14.07	29	29.59	6.35	7.25
THR	11.15	21	23.45	5.03	5.25
SER	12.34	27	25.96	5.57	6.75
GLU	19.97	41	41.99	9.01	10.25
PRO	5.38	6	11.31	2.43	1.50
GLY	11.94	20	25.12	5.39	5.00
ALA	12.19	25	25.63	5.50	6.25
CYS	2.22	4	4.66	1.00	1.00
VAL	5.86	13	12.32	2.64	3.25
MET	4.61	10	9.69	2.08	2.50
ILE	9.79	23	20.58	4.41	5.75
LEU	15.69	33	33.00	7.08	8.25
TYR	6.55	14	13.77	2.95	3.50
PHE	4.40	9	9.25	1.98	2.25
HIS	2.75	6	5.79	1.24	1.50
LYS	12.56	27	26.42	5.66	6.75
NH3	18.43	0	38.77	8.31	0.00
ARG	7.23	15	15.20	3.26	3.75

Name	Soll	korr. IST	ger. IST	ABW	ABW (%)
ASP	29	29.23	29	+ 0.225	0.777
THR	21	23.16	23	+ 2.159	10.283
SER	27	25.64	26	- 1.361	5.042
GLU	41	41.48	41	+ 0.478	1.167
PRO	6	11.17	11	+ 5.174	86.238
GLY	20	24.81	25	+ 4.806	24.032
ALA	25	25.31	25	+ 0.315	1.260
CYS	4	4.61	5	+ 0.606	15.150
VAL	13	12.17	12	- 0.828	6.366
MET	10	9.57	10	- 0.426	4.256
ILE	23	20.33	20	- 2.674	11.626
LEU	33	32.59	33	- 0.406	1.229
TYR	14	13.60	14	- 0.401	2.862
PHE	9	9.13	9	+ 0.132	1.472
HIS	6	5.72	6	- 0.285	4.748
LYS	27	26.09	26	- 0.908	3.363
NH3	0	38.29	0	0.000	0.000
ARG	15	15.01	15	+ 0.014	0.093

AS - Sollwert:

= 323

AS - Istwert:

= 330

Gesamtabweichung:

= 21.20 AS / 6.56%

Durchschnittliche Proteinmenge:

= 0,510 nanoMol

ALA/LEU-Proteinmenge:

= 0,482 nanoMol

Neu eingereicht / Newly filed  
Nouvellement déposé

FIG. 43b.

3v acb

1 / 21 / 88

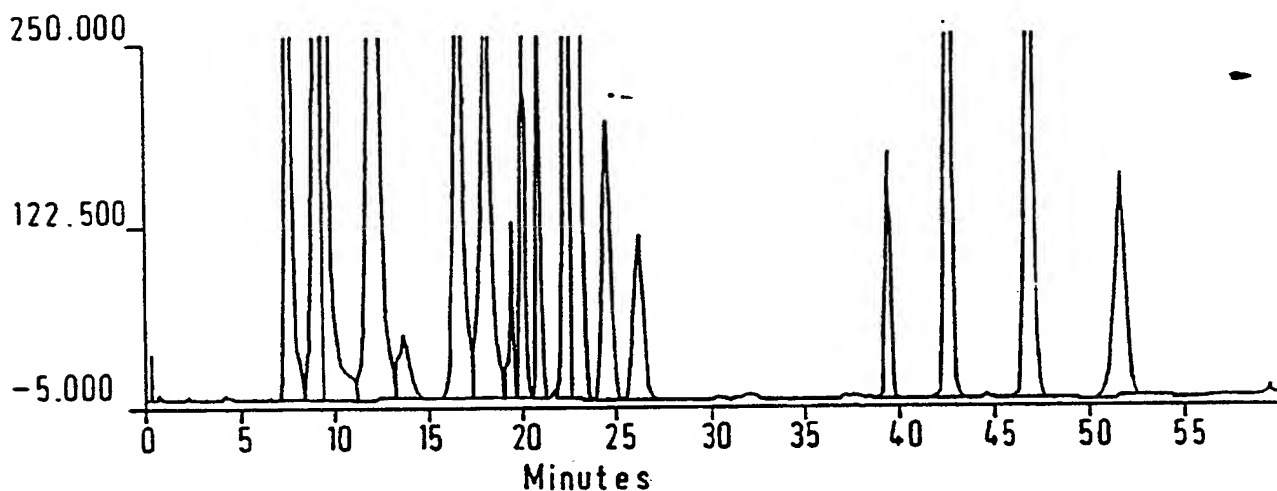
9 : 17 : 36

Acquisition method  
Units  
Channel  
Injection  
Run time  
Injection volume  
Internal standard amt  
Mode  
Version  
Description

ninrept  
None  
1  
-1  
60.00 min  
-1  $\mu$ L  
1.00  
Analysis  
REV 4.0

Quantitation method  
System number  
Vial  
Total injections  
Sample rate  
Sample amount  
Scale factor  
Response factors  
Channel to calibrate

ninrept  
2  
-1  
-1  
2 per sec  
1.00  
1.00  
Replace  
1



Peak Name	Ret time	Area	Height	Type	Amount	RF
ASP	7.67	12949108	589326	**	10.797	1.1993e+06
THR	9.13	9054415	359489	**	7.982	1.1344e+06
SER	9.67	13162093	508590	**	9.327	1.4112e+06
GLU	12.20	21594486	581113	**	15.972	1.3520e+06
PRO	13.73	1915825	42433	**	4.469	4.2872e+05
GLY	16.80	12516849	365363	**	9.017	1.3882e+06
ALA	18.27	11691803	288180	**	9.471	1.2345e+06
CYS	19.60	1605991	124559	**	0.864	1.8584e+06
VAL	20.13	5326578	424585	**	4.445	1.1982e+06
MET	20.93	4866785	296576	**	3.498	1.3911e+06
ILE	22.47	9170982	414630	**	7.277	1.2603e+06
LEU	23.07	16274567	687357	**	11.841	1.3744e+06
TYR	24.60	6190710	195610	BB	4.916	1.2593e+06
PHE	26.33	4001320	114100	BB	3.306	1.2105e+06
HIS	39.53	3146100	178088	BB	2.111	1.4904e+06
LYS	42.73	16208683	845200	BB	9.546	1.6980e+06
NH3	46.93	13233695	414891	BB	10.856	1.2190e+06
ARG	51.87	6455633	155589	BB	5.202	1.2409e+06

Neu eingereicht / Newly filed  
Nouvellement déposé

PROBE: 3.VAC 15 \* 5200 \* FR 54-SP.

SEQUENCER PROGRAMM: 3PAPTH

ABBAUSCHRITTE: 1+3P

PTH-AS-HPLC SIS

ABBAUSCHRITT Nr.: 3P

PTH-AS NACHWEISBAR

BIS ABBAUSCHRITT Nr.: 3P

36  $\mu$ g [n/nmol] PROBE GELÖST IN 75  $\mu$ L 0.1% TFA ; 3 x 25  $\mu$ L AM SEQUENCER AUFGETRAGEN

### SEQUENZ:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AS: 1-10	I.	X <sub>ALA</sub> <sup>1)</sup>	- TRP	- TRP	- LYS	- X <sub>ALA</sub> <sup>1)</sup>	- TRP	- ILE	- (GLU) <sup>2)</sup>	- GLN - (GLU) <sup>2)</sup>
AS: 11-20	I.	GLY	- VAL	- THR	- VAL	- LYS	- SER	- SER	- SER	- HIS <sup>3)</sup> - (PHE) -
AS: 21-30	I.	ASN	- PRO	- (ASP) <sup>4)</sup>	- PRO	- (ASP) -	X <sub>ALA</sub> <sup>1)</sup>	- X <sub>GLU</sub>	- THR	- LEU - TYR -
AS: 31-40	I.	LYS	- X <sub>ALA</sub> <sup>1)</sup>	- MET	- (LYS)	- GLY	- ILE	- GLY	- (THR)	- ASN -

1) PTH-ALA NACHWEIS GESTÖRT DURCH DHPTU (BIS ZU 12000000 IU (AS8)  $\approx$  10 nmol PTH-AS) [SEQUENCER DEFECT!]

2) RETENTIONSZEITEN VERLÖCHEN VON 1.05' AUF 2.45'

3) " " 5.50' AUF 4.20'

4) " " 1.66 AUF 1.87'

### MENGENABSCHÄTZUNG:

KORP- NENTE	AMINOSÄURE VON	BIS	MENGE [nmol]	AUTEIL [%]
I	1	(3P)	~0.45	/
II				
III				
IV				
V				
VI				
VII				
VIII				

GESAMTMENGE: ~0.45 nmol  
(BERECHNET AUS ILE 7-8, 70% R.Y.)

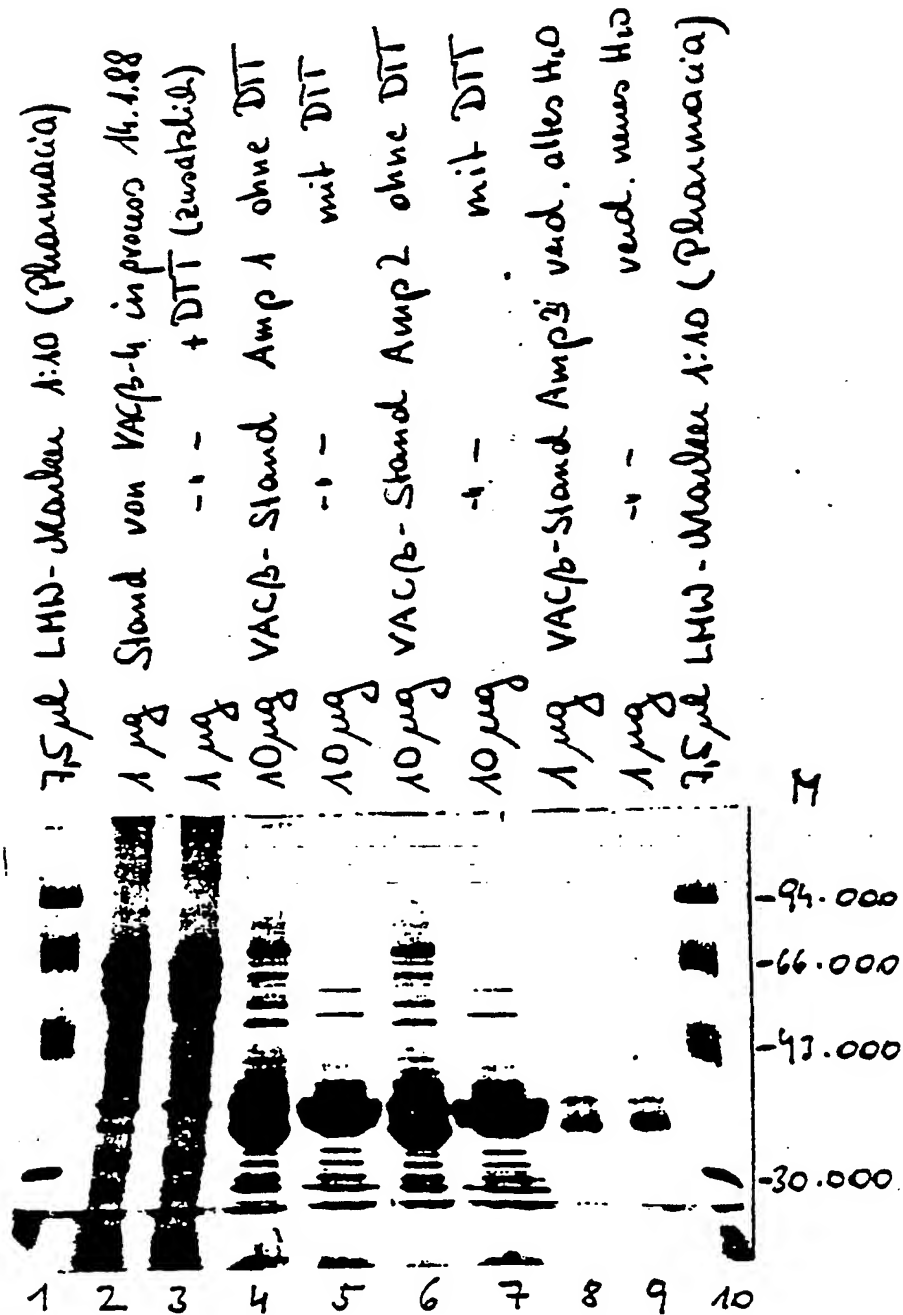
VERGLEICHE MIT: 1240

SDS - GeldelektrophoreseVAC $\beta$  - Standardvergleiche

Fig. 45

12,5% SDS - PAGE

Coomassiefärbung



ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG (PAGIF)

pH - Bereich: 3.5-9.5

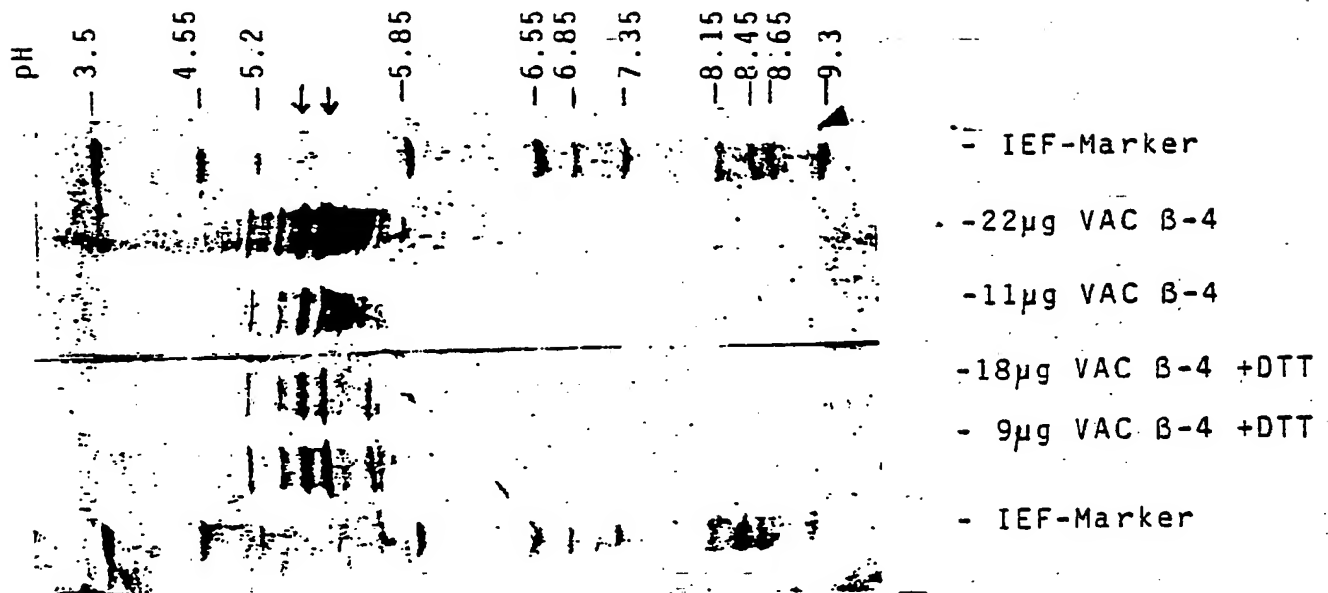
Platten-Fabrikat : LKB-PAGplate

Elektrodenlösungen: Anode 1 M Phosphorsäure

Kathode 1 M Natronlauge

Laufzeit: Präfokussierung 500 Vh

Fokussierung 3000 Vh



VAC B-4 : 1. Hauptbande pI 5.35

2. Hauptbande pI 5.45 + DTT

Fig. 46 b

ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG pH 3,5 - 9,5  
mit VAC  $\beta$ -4 ( $\pm$  DTT Reduktion)

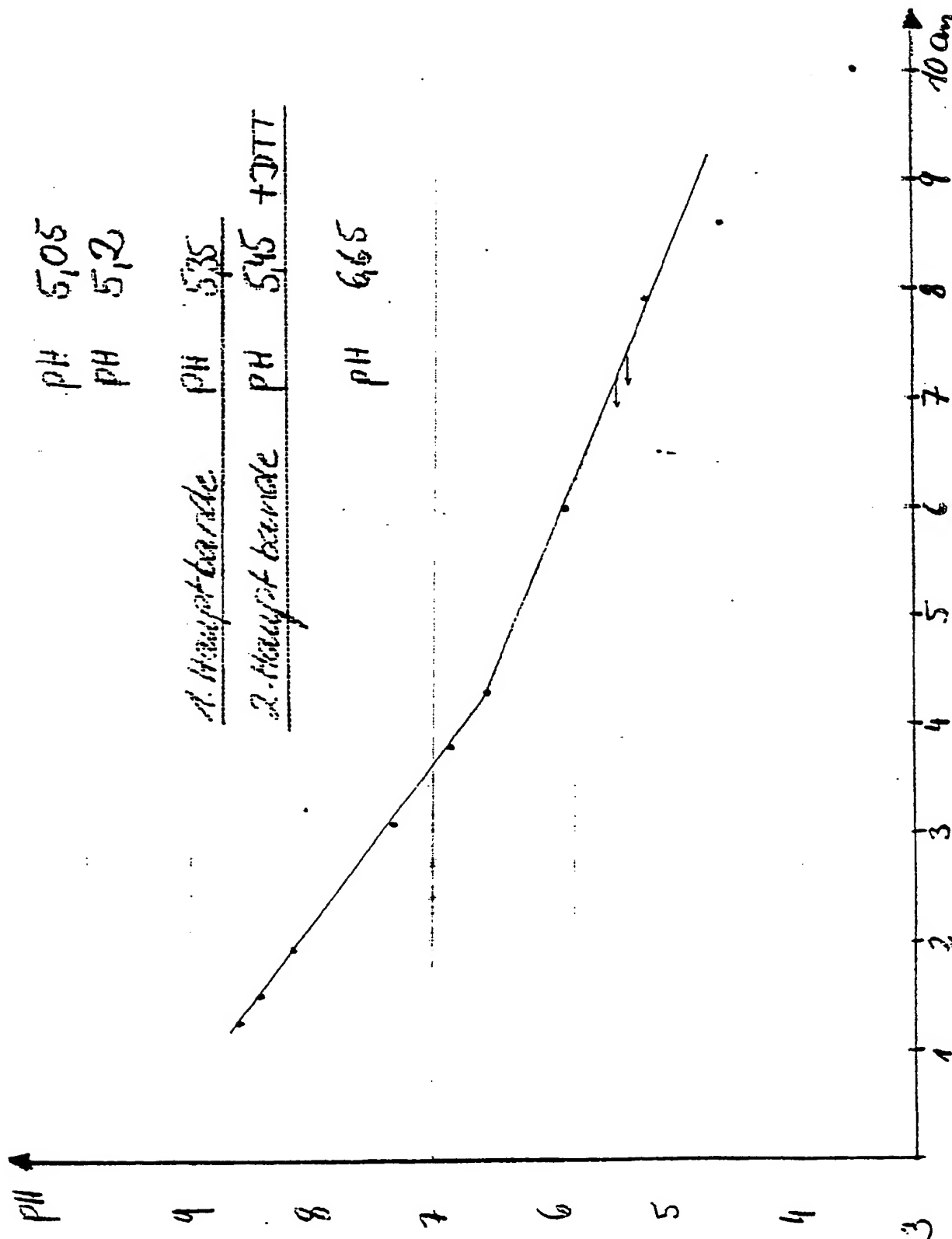


Fig. 47

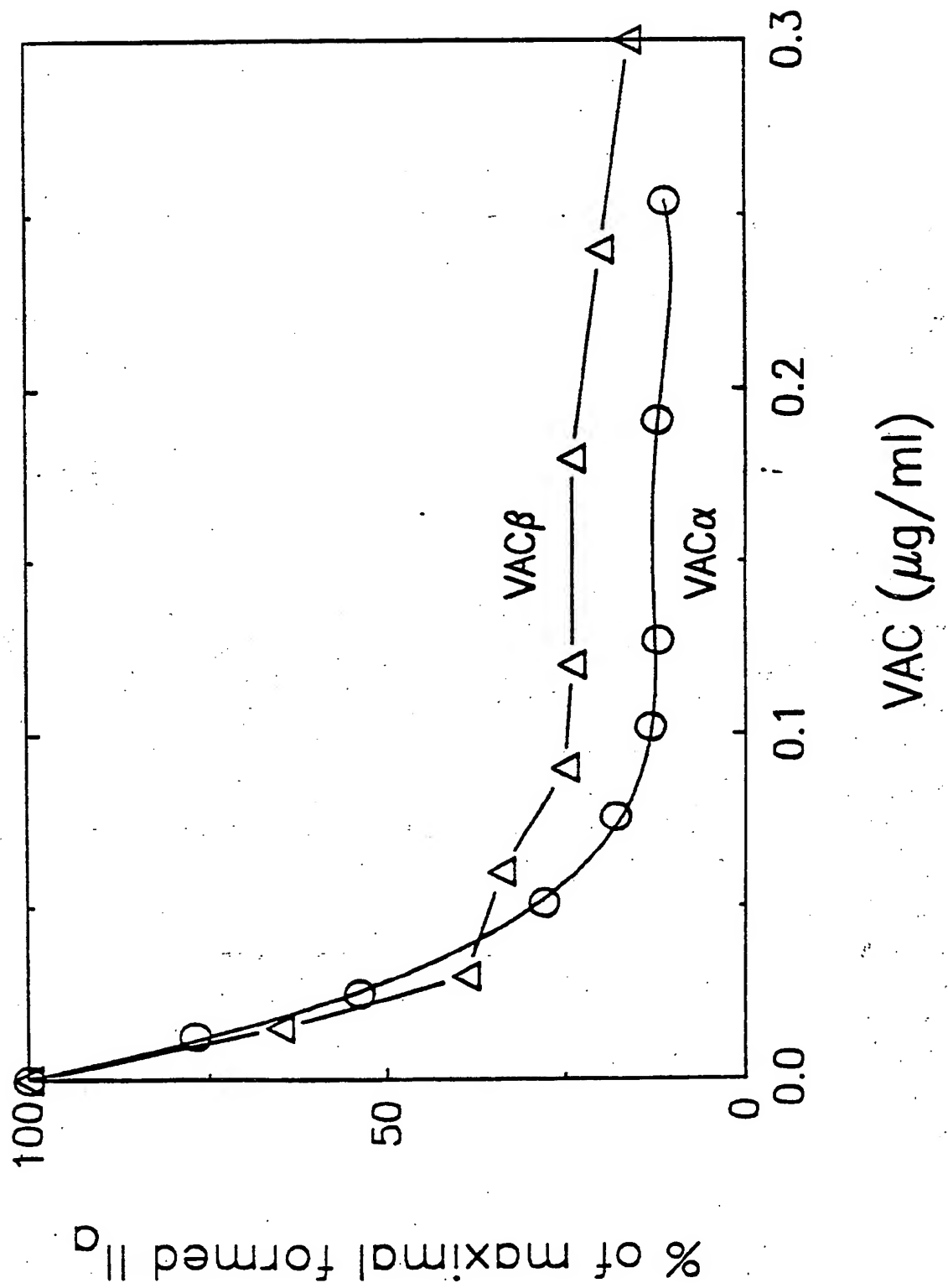


Fig. 48

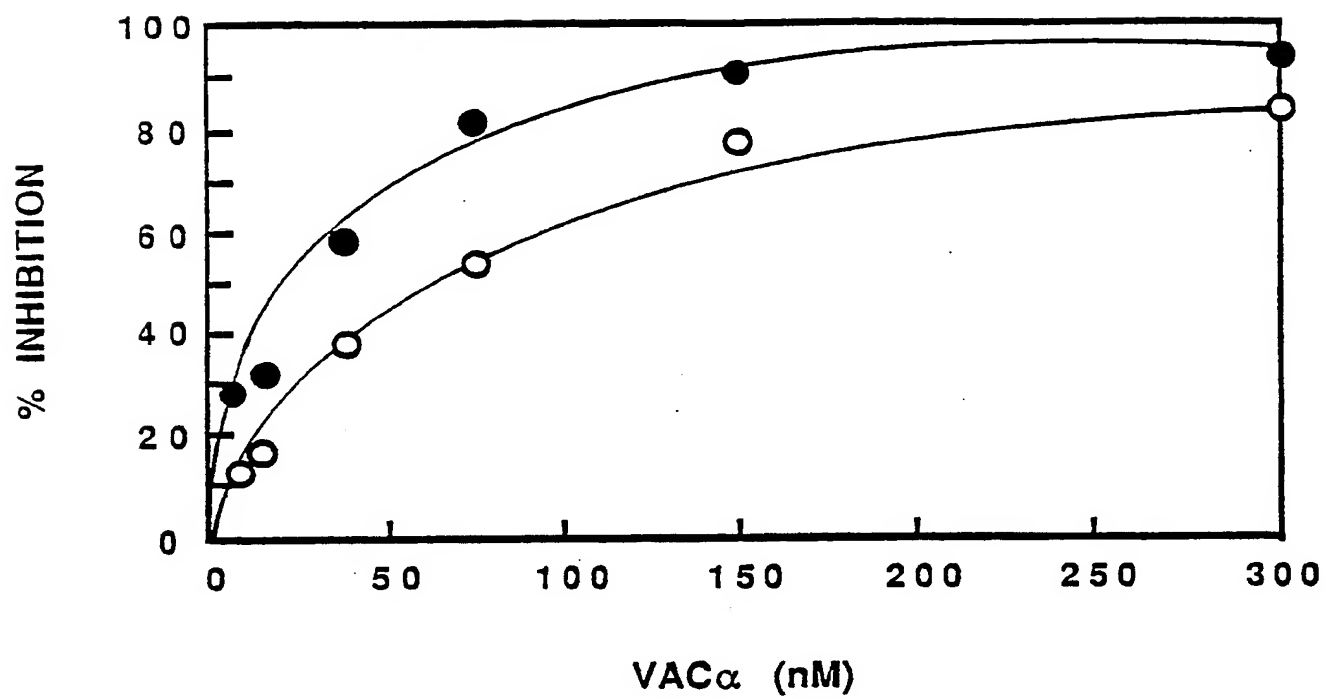




Fig. 49.

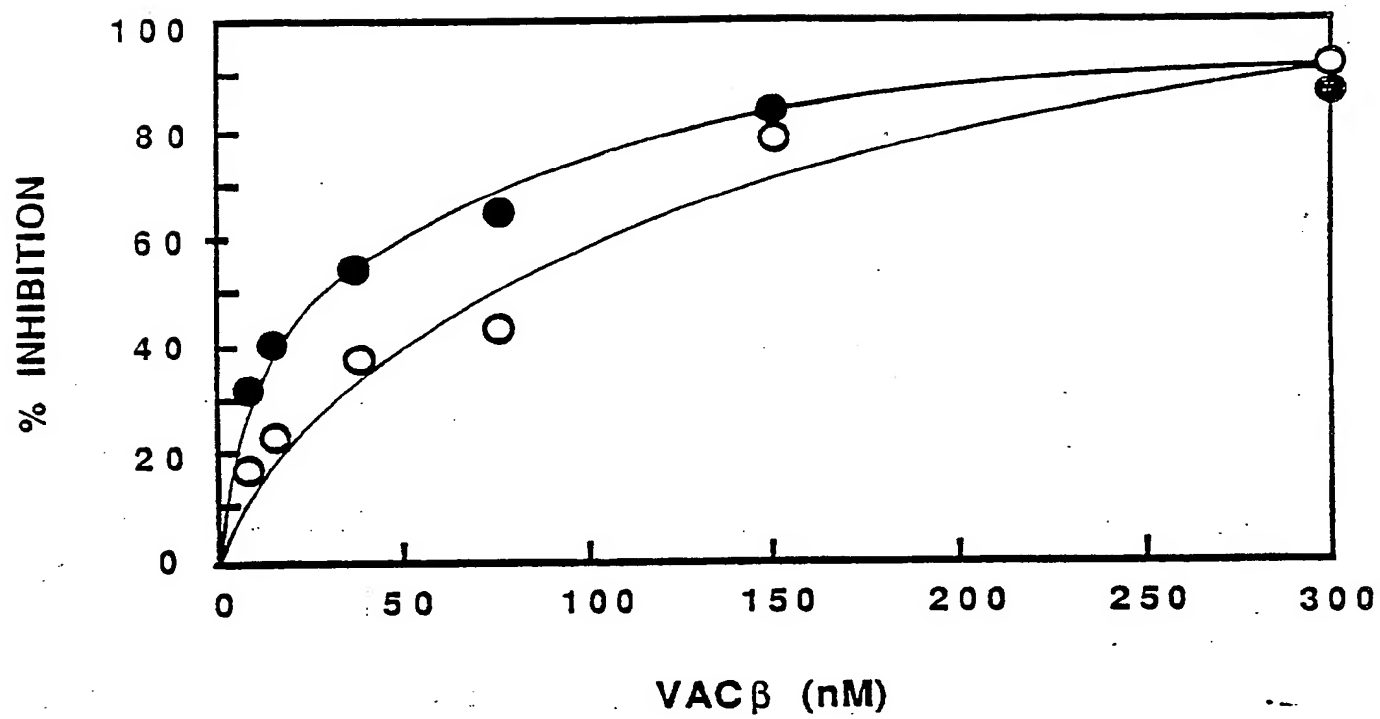


Fig. 50

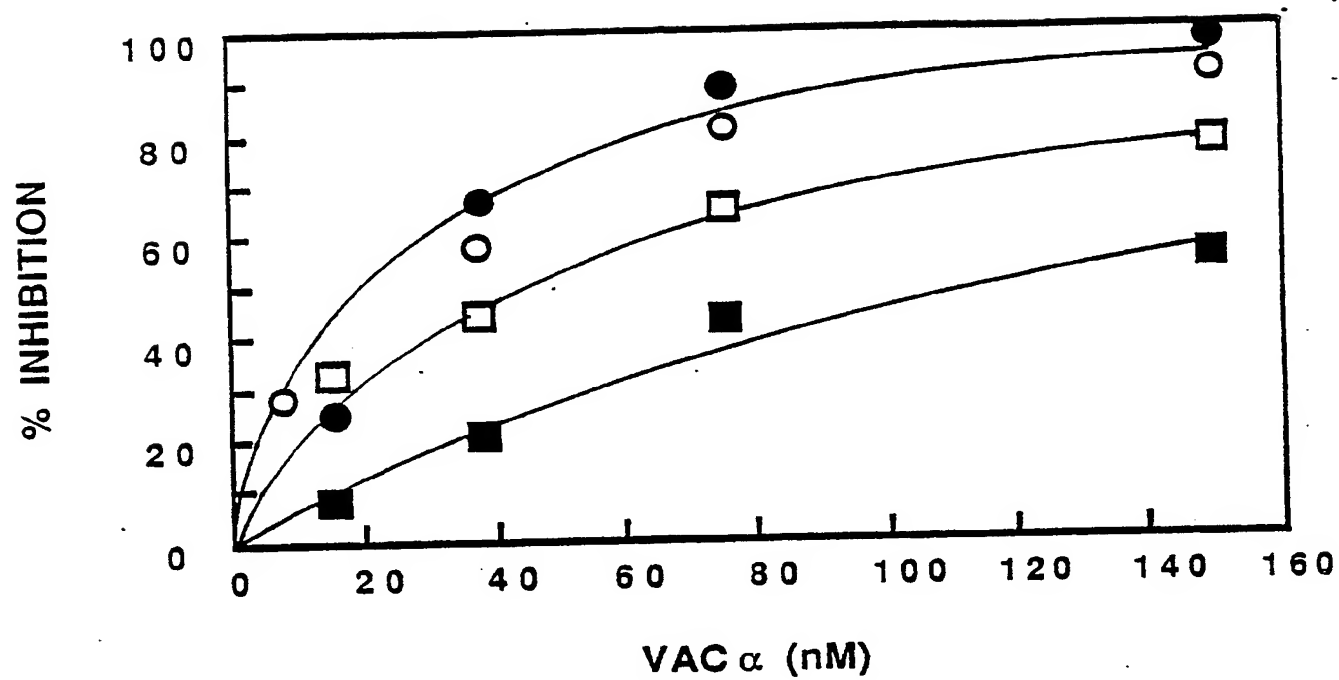
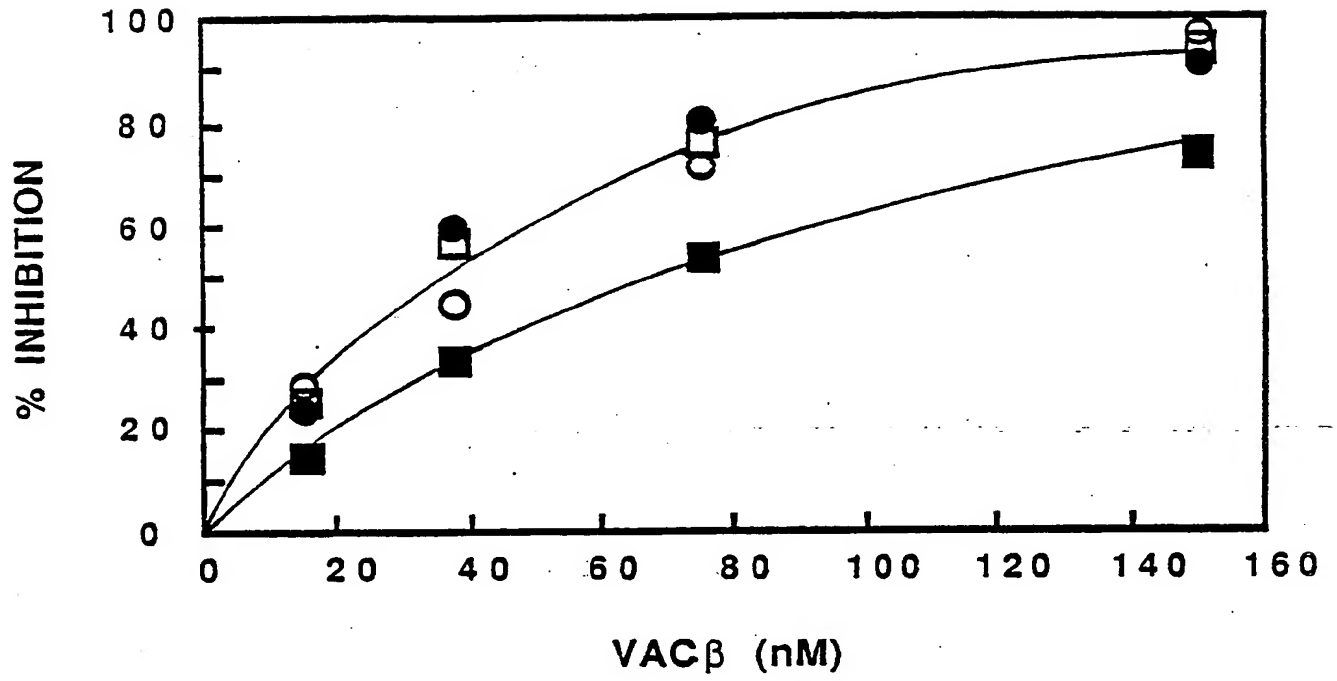


Fig. 51





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 88104916.7
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
D, X	EP - A1 - O 181 465 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL G.M.B.H.) * Seiten 4-8; Ansprüche 21,22 *	39-47, 54,57- 60,69, 70	C 12 N 15/00 C 07 H 21/04 C 12 N 1/20
D, A	--	1	C 07 K 13/00 C 12 P 21/00
D, A	NATURE, Band 320, Nr. 6057, 6. März 1986, New York, London B.P.WALLNER et al.; "Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A <sub>2</sub> inhibitor with potential anti-inflammatory ac- tivity" Seiten 77-81 * Gesamt *	16,66- 68	A 61 K 37/02 C 12 N 5/00 G 01 N 33/577 C 12 N 15/00, C 12 R 1:19
D, A	CELL, Band 46, Nr. 2, 18. Juli 1986, Cambridge, Mass., USA K.-S.HUANG et al.; "Two Human 35 kd inhibitors of Phospholipase A <sub>2</sub> Are Related to Substrates of pp 60 <sup>v-src</sup> and of the Epidermal Growth Factor Receptor/Kinase" Seiten 191-199 * Gesamt *	16,66- 68	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4) C 12 N C 07 H C 07 K C 12 P A 61 K G 01 N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 16-06-1988	Prüfer WOLF
<div><div><p>EPA Form 1503 03 82</p><p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p><p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet</p><p>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</p><p>A : technologischer Hintergrund</p><p>O : nichtschriftliche Offenbarung</p><p>P : Zwischenliteratur</p><p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p></div><div><p>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p><p>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</p><p>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</p><p>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p></div></div>			



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 88104916.7		
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)		
D,A	CELL, Band 46, Nr. 2, 18. Juli 1986 Cambridge, Mass., USA C.J.M.SARIS et al.; "The cDNA Sequence for the Protein-Tyrosine Kinase Substrate p 36 (Calpactin/Heavy Chain) Reveals a Multi-domain Protein with Internal Repeats" Seiten 201-212 * Gesamt *	16,66-68			
D,A	ANNUAL REVIEW BIOCHEMISTRY, Band 52, 1983, Standford, USA J.TRAVIS et al.; "Human Plasma Proteinase Inhibitors" Seiten 655-709				
D,A	ANNUAL REVIEW BIOCHEMISTRY, Band 49, 1980, Standford, USA C.M.JACKSON et al.; "Blood Coagulation" Seiten 765-811		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)		
D,A	THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Band 74, 1984, New York R.D.ROSENBERG et al.; "Natural Anticoagulant Mechanisms" Seiten 1-6				
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.					
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 16-06-1988	Prüfer WOLF		
<table border="0"><tr><td><b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td><b>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</b> <b>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</b> <b>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</b>  <b>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</b></td></tr></table>				<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	<b>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</b> <b>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</b> <b>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</b>  <b>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</b>
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	<b>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</b> <b>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</b> <b>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</b>  <b>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</b>				

EPA Form 1503 03/82

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**